



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio de la regulación de los sistemas implicados en la absorción y translocación de potasio en *Arabidopsis thaliana* L. y *Solanum lycopersicum* L.

D^a. Reyes Ródenas Castillo

2019



ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio de la regulación de los sistemas implicados en la
absorción y translocación de potasio en *Arabidopsis thaliana* L. y
Solanum lycopersicum L.**

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

Reyes Ródenas Castillo

2019

Directores de la Tesis:

Francisco Rubio Muñoz

Investigador Científico CEBAS-CSIC

Vicente Martínez López

Profesor de Investigación CEBAS-CSIC

Tutor Universidad de Murcia:

Francisco Rubio Muñoz

Investigador Científico CEBAS-CSIC

PUBLICACIONES

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

Rubio F., Fon M., Ródenas R., Nieves-Cordones M., Alemán F., Rivero R.M., Martínez V. (2014). A low K^+ signal is required for functional high-affinity K^+ uptake through HAK5 transporters. *Physiologia Plantarum* 152(3): 558-570.

Hayet B., Ródenas R., López-Gómez E., García-Legaz F., Nieves-Cordones M., Rivero R.M., Martínez V., Botella M.A., Rubio F. (2015). High Ca^{2+} reverts the repression of high-affinity K^+ uptake produced by Na^+ in *Solanum lycopersicum* L. (var. microtom) plants. *Journal of Plant Physiology* 180(0): 72-79.

Ragel P.*, Ródenas R.*, García-Martín E., Andrés Z., Villalta E., Nieves-Cordones M., Rivero R.M., Martínez V., Pardo J.M., Quintero F.J., Rubio F. (2015). The CBL-Interacting Protein Kinase CIPK23 Regulates HAK5-Mediated High-Affinity K^+ Uptake in Arabidopsis Roots. *Plant Physiology* 169 (4): 2863-2873.

Ródenas R.*, Nieves-Cordones M.*, Rivero R.M., Martínez V., Rubio F. (2017). Pharmacological and gene regulation properties point to the SIHAK5 K^+ transporter as a system for high-affinity Cs^+ uptake in tomato plants. *Physiologia Plantarum* 162(4): 455-466.

Ródenas R., García-Legaz M.F., López-Gómez E., Martínez V., Rubio F., Botella M.A. (2017). NO_3^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} deprivation reduced LKT1-mediated low-affinity K^+ uptake and SKOR-mediated K^+ translocation in tomato and Arabidopsis plants. *Physiologia Plantarum* 160(4): 410-424.

* Primer autor compartido.

FINANCIACIÓN

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación por los siguientes proyectos:

- ‘Abordajes moleculares para la mejora de la nutrición de K^+ en plantas. Percepción y señalización de K^+ y regulación de su absorción’, con referencia AGL2012-33504, financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España.
- ‘Nutrición de K^+ en plantas: identificación de mecanismos de regulación y de nuevos sistemas de absorción de K^+ por la raíz’, con referencia AGL2015-66434-R, financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España.
- Red temática ‘Sistemas de Transporte de Sodio y Potasio en Plantas’, con referencia BIO2016-81957-REDT, financiada por la Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España.

La firmante de la presente Tesis Doctoral ha disfrutado de un contrato predoctoral del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU), con referencia FPU13/03184, concedido por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Gobierno de España.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, Dr. Francisco Rubio Muñoz y Dr. Vicente Martínez López, por su supervisión, dirección y apoyo durante estos años.

Agradecer a la Dra. Sabine Hilfiker y al Dr. Miguel Navarro, por 'introducirme' en el mundo de la investigación y a la Dra. Rosa Rivero por 'reclutarme' en el Grupo de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC. Extender mi gratitud a la Dra. M^a Ángeles Botella, Dr. Francisco García, Dr. Francisco García-Legaz, Dra. Elvira López, Dra. M^a Ángeles Pedreño y a la Dra. Pilar Torrente, por toda la ayuda mostrada.

Al Dr. Javier Quintero y al Dr. José Manuel Pardo (IBVF-CSIC), así como a los miembros de sus grupos de investigación, por su contribución a la realización de esta Tesis Doctoral.

A los colaboradores de mi estancia en la Universidad de Nottingham: Prof. Malcolm Bennett, Prof. Charlie Hodgman, Dr. Rahul Bhosale, Dr. Tom Giles, Dra. Ute Voß y al resto de miembros, por haberme acogido en su grupo. Y a Juanjo, por todos los consejos antes de irme.

A mis compañeros de laboratorio: Manolo, por todo lo aprendido a tu lado; a Alberto, por sacar tiempo para 'echarme una mano' siempre que lo he necesitado. Y agradecer de nuevo a Paco Rubio, por la paciencia, confianza y amistad mostrada en cada momento.

A Tere y a Silvia, porque es imposible encontrar unas amigas y compañeras de despacho mejores. Gracias por todos los buenos momentos, dentro y fuera del CEBAS.

Al resto de miembros del departamento, destacando a Marina y María, las mejores 'discípulas'; y a Daymi, María 'gallega' y M^a Carmen, los nuevos 'fichajes'. Por supuesto, agradecer toda la ayuda proporcionada por Diana, Lidia, Cristina y M^a Carmen, y por 'mi ejército de prácticas', en especial a Ulises y los 'primos', por traer buen ambiente y risas. También agradecer a Lolo, Blanca, Edu, Carlos y M^a Carmen, toda la ayuda prestada (y lo que no es ayuda), siempre con una sonrisa. A todo el personal del CEBAS que, en mayor o menor medida, me ha ayudado durante estos años. Especial mención a Jesús, por repartir alegría cada mañana con el café.

A todos con los que he compartido momentos de 'desconexión', saliendo a correr o jugando al pádel: Paco, Vicente, Tere, Silvia, César, Juan Miguel, Félix, Manolo, Alberto, Ulises, Jesús, Álvaro, etc. Y por las cervezas de después, que nunca faltan.

A Elvira, Patricia, Enma, Maribel, Sandra, Paula, Simon, 'Cabopaleros' y 'BSP' (Paloma, Ana, Olivia y Claudia), por estar siempre cerca, a pesar de la distancia. Y a las nuevas incorporaciones: Virginia, Mari Fe y Paloma, por toda la alegría y locura que habéis traído.

A mi graaaan familia y a mi familia 'política', por el ánimo y el apoyo, sobre todo estos últimos meses.

A Tomás, por enseñarme que no existen límites y a dar lo mejor de mí en cada momento. Por todo lo que hemos vivido y construido desde que nuestros caminos se juntaron para formar uno solo. Por la alegría que nuestra pequeña familia me da. Gracias por estar, siempre.

A mis padres, Pepa y Nacho, y a mi hermana Claudia, porque todo lo que soy es gracias a vosotros. Gracias por el apoyo y la fuerza que me transmitís cada día. Sois el mejor ejemplo de superación y valentía.

Esta Tesis lleva un trocito de cada uno de vosotros. GRACIAS por hacerlo posible.

**A mi familia y
a Tomás**

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1- Importancia del potasio para las plantas	3
1.1- Funciones del K ⁺ y síntomas de deficiencia.....	3
1.2- El K ⁺ en la agricultura	6
2- Caracterización molecular de la absorción y transporte de K⁺	8
2.1- Absorción de K ⁺ a través de la raíz.	8
2.2- Proteínas responsables del transporte de K ⁺ a través de membrana en raíces de plantas.....	11
2.3- Relevancia fisiológica del transportador HAK5 y del canal AKT1 en la absorción de K ⁺ por las raíces de las plantas.....	19
2.4- Factores que afectan a la nutrición de K ⁺	21
3- Mecanismos implicados en la respuesta de las plantas a la deficiencia de K⁺	24
3.1- Mecanismos de detección y señalización en respuesta a la deficiencia de K ⁺	24
3.2- Mecanismos de regulación en respuesta a la deficiencia de K ⁺	36
4- El K⁺ y otros nutrientes.	42
5- Plantas modelo y de interés agronómico.	43
5.1- Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.), planta modelo.	43
5.2- Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), planta de interés agronómico.....	44
II. OBJETIVOS	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS	53
1- Material biológico	55
1.1- Bacterias.....	55
1.2- Levaduras.	57
1.3- Material vegetal.	60
2- Métodos	66
2.1- Manipulación de material biológico.	66
2.2- Manipulación de ácidos nucleicos.	81
2.3- Manipulación de proteínas.	93
2.4- Análisis bioinformático.....	101
2.5- Análisis estadístico.	112
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	115
CAPÍTULO 1: INFLUENCIA DEL SUMINISTRO DE NO₃⁻ PO₄³⁻ Y SO₄²⁻ EN LA HOMEOSTASIS DE K⁺.	117

Índice

1- Caracterización de la absorción de K^+ de baja afinidad y translocación de K^+ en condiciones de deficiencias nutricionales.....	119
2- Caracterización de la absorción de K^+ de alta afinidad en condiciones de deficiencias nutricionales.....	138
DISCUSIÓN.....	155
CAPÍTULO 2: ESTUDIO DEL TRANSPORTADOR DE K^+ DE ALTA AFINIDAD HAK5	161
1-Estudio de los mecanismos implicados en la regulación transcripcional del transportador de K^+ de alta afinidad <i>SlHAK5</i> en plantas de tomate.	163
2-Estudio de los mecanismos implicados en la regulación postranscripcional/ postraduccional del transportador de K^+ de alta afinidad HAK5.	181
3- Residuos de AtHAK5 implicados en el transporte de K^+	207
DISCUSIÓN.....	214
CAPÍTULO 3: PAPEL DEL TRANSPORTADOR HAK5 EN LA ABSORCIÓN DE Cs^+ EN PLANTAS DE TOMATE.....	235
1- Efecto de la presencia de altas concentraciones de Cs^+ sobre la absorción de K^+ de alta afinidad.....	238
2- Absorción de Cs^+ en el rango de baja afinidad.....	242
3- Absorción de Cs^+ en el rango de alta afinidad.	244
DISCUSIÓN.....	252
CAPÍTULO 4: ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE PLANTAS DE TOMATE SUJETAS A AYUNO DE K^+.....	257
1- Diseño experimental y secuenciación.....	259
2-Análisis bioinformático de los datos de RNA-seq.	263
3-Análisis de transcritos expresados diferencialmente.	266
DISCUSIÓN.....	279
V. CONCLUSIONS	289
VI. SUMMARY	295
1.Introduction	297
2.Objectives.....	297
3.Methodology.....	298
4.Results and discussion.....	301
VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO	309
VIII. ANEXOS.....	337
Anexo 1. Abreviaturas y símbolos.	339
Anexo 2. Cebadores de oligonucleótidos.....	342
Anexo 3. Plásmidos.	345

Anexo 4. Obtención de líneas mutantes homocigotas de <i>A. thaliana</i>	347
Anexo 5. Inserción del epítipo de la hemaglutinina en AtHAK5.	349
Anexo 6. Generación de construcciones de AtHAK5 con deleciones en su dominio C-terminal.....	350
Anexo 7. Generación de construcciones para el ensayo de Y2H.	358
Anexo 8. Generación de construcciones para el ensayo de BiFC.....	362
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	365

I. Introducción

1- IMPORTANCIA DEL POTASIO PARA LAS PLANTAS

El potasio (K^+) es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de la planta, siendo el catión más abundante en los tejidos vegetales (representa entre el 1 y el 10 % del peso seco de la planta) (Leigh, R.A. y Wyn Jones, R.G., 1984). Es un componente imprescindible en las células vivas y todas deben conservar unos niveles adecuados del mismo para crecer y mantenerse con vida. Mientras que la concentración de este nutriente en el suelo oscila entre 0,1 y 1 mM, en el citosol se mantiene en torno a 100 mM (Leigh, R.A. y Wyn Jones, R.G., 1984). La concentración citosólica está sometida a un control homeostático muy estricto, mientras que en compartimentos subcelulares es variable en función del estado de la planta. En la vacuola oscila entre 10 y 200 mM y en las células oclusivas de los estomas puede alcanzar hasta 500 mM. El K^+ muestra una alta movilidad en las plantas, translocándose entre la raíz y parte aérea por el xilema y floema (Karley, A.J. y White, P.J., 2009), lo que posibilita la movilización de este nutriente a lo largo de toda la planta en función de los requerimientos.

1.1- FUNCIONES DEL K^+ Y SÍNTOMAS DE DEFICIENCIA.

El K^+ participa en una serie de procesos bioquímicos y biofísicos muy importantes para la planta, llevando a cabo funciones vitales en el metabolismo celular, en el crecimiento vegetal y en la adaptación a estreses. Estas funciones quedan aseguradas gracias, por una parte, al mantenimiento de una concentración estable de K^+ en los compartimientos metabólicamente activos (como citoplasma, núcleo, estroma de cloroplastos y matriz mitocondrial); y por otra, al movimiento de este catión a todos los niveles (celular, tisular y transporte a través del xilema y floema) (Marschner, P., 2012)

Al estar cargado positivamente y ser tan abundante, el K^+ es un estabilizador de moléculas cargadas negativamente, como los ácidos nucleicos y las proteínas (Figura 1). Además, participa en la actividad de un gran número de enzimas, mediante su unión a ellas y posterior inducción de cambios conformacionales que incrementan la velocidad de la reacción catalítica (V_{max}) y, en algunos casos, la afinidad por el sustrato (K_m) (Figura 1). Esta unión es muy selectiva para el K^+ , y no puede ser sustituido por otros iones como el Na^+ o el Li^+ (Marschner, P., 2012; Suelter, C.H., 1970). Cuando hay deficiencia de K^+ , se producen una serie de alteraciones

Introducción

metabólicas que incluyen la acumulación de carbohidratos de bajo peso molecular y compuestos nitrogenados solubles y la disminución de almidón. Esto es debido a que algunas enzimas implicadas en el metabolismo de estos compuestos están reguladas por el K^+ (Marschner, P., 2012).

También desempeña un papel esencial en la síntesis de numerosas proteínas (Figura 1), entre las que destacan la ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo) y la nitrato reductasa, claves en el metabolismo de la planta. Esto se pone de manifiesto en plantas deficientes en K^+ , en las que se observa una acumulación de aminoácidos, amidas y nitratos (Marschner, P., 2012).

El K^+ es esencial en el flujo de protones a través de la membrana de los tilacoides, siendo necesario para el establecimiento del gradiente de pH que impulsa la síntesis de ATP a través de la fotofosforilación (Tester, M. y Blatt, M.R., 1989). Como ya se ha mencionado, es requerido para la actividad de la enzima RuBisCo y para la fijación del CO_2 en el cloroplasto (Marschner, P., 2012), por lo que la deficiencia de K^+ reduce la actividad fotosintética y la translocación del carbono fijado (Marschner, P., 2012; Zhao, D.L. y col., 2001; Szczerba, M.W. y col., 2009).

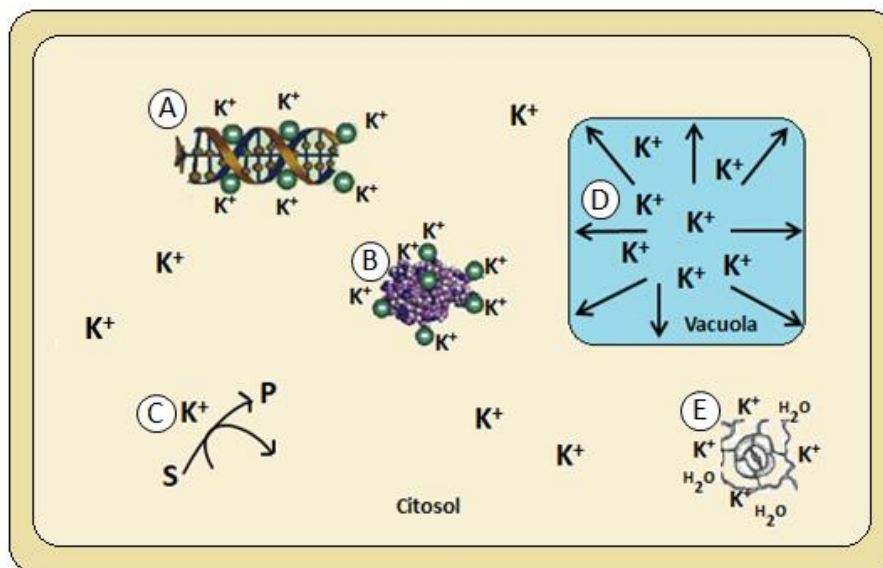


Figura 1. Principales funciones del K^+ en la célula. Las propiedades caotrópicas del K^+ lo convierten en el ion ideal para contrarrestar las cargas negativas en los ácidos nucleicos (A), y proteínas (B). El K^+ activa enzimas específicas (C) actuando como cofactor en reacciones enzimáticas que convierten un sustrato (S) en producto (P). El K^+ es el principal catión en la vacuola (D), donde genera la turgencia necesaria para mantener la estructura y facilitar la expansión celular, el crecimiento de la planta y la regulación de la apertura estomática (E). Figura modificada de Maathuis, F.J.M., 2009.

Es el principal soluto inorgánico osmóticamente activo en la vacuola, y su acumulación es responsable de la generación del potencial osmótico y la turgencia celular (Figura 1) (Marschner, P., 2012; Amtmann, A. y col., 2004; Britto, D.T. y Kronzucker, H.J., 2008). Fenómenos como la expansión celular, la apertura y cierre de estomas, el desarrollo del tubo polínico y el tropismo de la planta, son originados por cambios en la presión osmótica y en la turgencia celular, a consecuencia de la alta movilidad del K^+ (Britto, D.T. y Kronzucker, H.J., 2008). Por tanto, en situación de deficiencia de este ion, se producen numerosos trastornos relacionados con estas funciones, resultando en la disminución del crecimiento, alteración en la transpiración, etc. (Marschner, P., 2012; Gierth, M. y Maser, P., 2007).

El transporte de K^+ a través de la membrana plasmática es clave en la regulación del potencial eléctrico de la misma en las células vegetales (Cheeseman, J.M. y Hanson, J.B., 1979). La concentración externa de K^+ da lugar a cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática, debido a su transporte pasivo mediado por canales. La dirección de este transporte es determinada por el potencial de difusión del K^+ (Cheeseman, J.M. y Hanson, J.B., 1979; Maathuis, F.J.M. y Sanders, D., 1993a) . Así, el aumento de la concentración externa de K^+ origina una mayor entrada de este catión, provocando una rápida despolarización de la membrana; mientras que la disminución de la concentración externa de K^+ , da lugar a la salida del mismo causando una hiperpolarización (Britto, D.T. y Kronzucker, H.J., 2008). Alteraciones del potencial de membrana por otras causas son rectificadas por el transporte de K^+ a través de canales regulados por voltaje. Los canales de eflujo de K^+ se abren cuando se produce una despolarización de la membrana, causando su repolarización; y la apertura de los canales de influjo de K^+ , contrarrestan una hiperpolarización (Lebaudy, A. y col., 2007).

Un contenido de K^+ inferior a 10 g kg^{-1} de peso seco en la planta, provoca síntomas de deficiencia en la mayoría de especies vegetales. Los síntomas visibles comienzan con el amarillamiento y clorosis de las hojas, que se vuelven necróticas con la progresión de la deficiencia, y bajo condiciones severas da lugar a la muerte de los meristemos laterales y terminales (Marschner, P., 2012; Amtmann, A. y col., 2004) . Además, las plantas deficientes en K^+ son más susceptibles a los estreses bióticos y abióticos como la sequía, el frío y la salinidad; y al ataque de hongos, insectos y otros patógenos (Amtmann, A. y col., 2008).

Por todo esto, la deficiencia de K^+ es uno de los factores más importantes que afectan al rendimiento de los cultivos, provocando una reducción de la cantidad y de la calidad de la producción (Marschner, P., 2012).

1.2- EL K⁺ EN LA AGRICULTURA

El K⁺ representa aproximadamente el 2,6 % de la corteza terrestre y su concentración en el suelo oscila entre 0,1 y 1 mM. Sin embargo, la mayor parte del K⁺ no está disponible para las plantas (Maathuis, F.J.M., 2009). En función de su disponibilidad para ser absorbido por la planta, el K⁺ se clasifica en 4 tipos (Figura 2): 1) K⁺ soluble, en la solución del suelo, pudiendo ser absorbido por las plantas de forma inmediata; 2) K⁺ intercambiable (EK, del inglés '*exchangeable K*'), que es la forma iónica del K⁺ unido electrostáticamente a los materiales que componen la fase sólida mineral y orgánica; 3) K⁺ de intercambio lento (SEK, del inglés '*slowly exchangeable K*'), localizado en los espacios interlaminares de los minerales de arcilla; y 4) K⁺ estructural, que es la fracción que se encuentra formando parte de los minerales, y constituye un 90-99 % del K total (Rengel, Z. y Damon, P.M., 2008).

La solución del suelo es la fuente fundamental de K⁺ para su absorción por las raíces de las plantas. Aunque este K⁺ representa únicamente el 0,1-0,2 % del total del suelo, está en equilibrio dinámico con el K⁺ intercambiable y, en menor medida, con el K⁺ de intercambio lento. Estas dos últimas fuentes, constituyen alrededor del 1-2 % y del 1-10 %, respectivamente, y son las principales reservas para la absorción por parte de la planta. A medida que la cantidad de K⁺ en solución disminuye, la fracción intercambiable (EK) se libera rápidamente, quedando inmediatamente disponible para la planta. La fracción lentamente intercambiable (SEK) se libera al erosionarse los minerales arcillosos (Mengel, K. y col., 2001). La última fuente de K⁺ va reponiendo lentamente las otras dos fuentes (EF y SEK). En la Figura 2 se representa el ciclo del K⁺ en el suelo, indicando los tipos según su disponibilidad, y los distintos procesos de ganancia y pérdida que los relacionan.

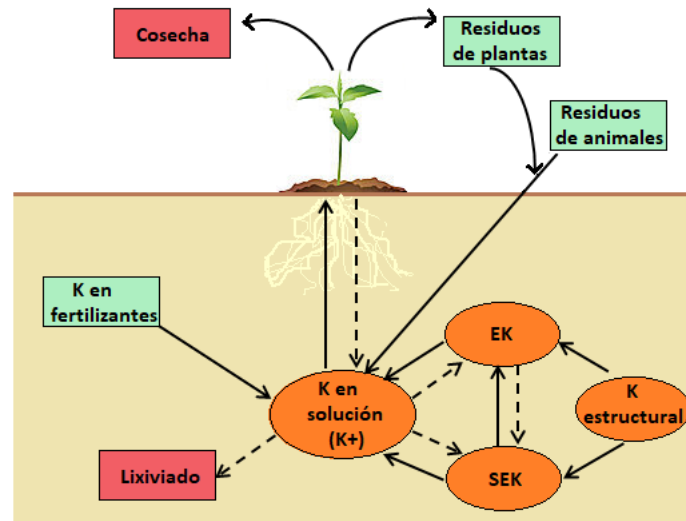


Figura 2. El ciclo del K^+ en el suelo. Los círculos naranjas representan los cuatro tipos de K^+ según su disponibilidad para ser absorbido por las raíces de las plantas. Los cuadrados verdes, las fuentes de K^+ externas que aportan K^+ en solución del suelo. Los cuadrados rojos representan las causas de pérdida de K^+ para ser absorbido. Las flechas continuas indican el aporte de K^+ para ser absorbido y las líneas discontinuas, el flujo de K^+ en dirección contraria a su absorción por la planta. Figura adaptada de (Römheld, V. y Kirkby, E., 2010).

Con el crecimiento de la población mundial y la expansión de la agricultura, el consumo de K^+ también aumenta. La IFA (del inglés, '*International Fertilizer Association*') prevé que la demanda mundial de fertilizantes alcance 199 millones de toneladas de nutrientes en 2022/23, habiendo sido de 187 millones de toneladas en 2017/18. En porcentaje, el consumo mundial de fertilizantes aumentará un 1,3% anual entre la media de los años 2015/16-2017/18 y 2022/23 (creciendo un 1 % anual el de nitrógeno, un 1,4 % el de fosfato y un 1,8 % el de potasio) (el informe de IFA "Fertilizer Outlook 2018-2022" se encuentra disponible en el enlace: <https://www.ifastat.org/market-outlooks>).

La utilización masiva de fertilizantes conlleva a la acumulación de una gran cantidad de nutrientes inorgánicos en los suelos de cultivo, que alteran los ciclos geoquímicos normales de los nutrientes, además de provocar una contaminación progresiva y la salinización del suelo y las aguas (Kayser, M. y Isselstein, J., 2005; Drinkwater, L.E. y Snapp, S.S., 2007). En concreto, el uso de fertilizantes potásicos promueve que parte del K^+ de la solución de suelo, deje la solución y se una a la material coloidal de la fase sólida (Steingrobe, B. y Claassen, N., 2000).

2- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE K⁺.

2.1- ABSORCIÓN DE K⁺ A TRAVÉS DE LA RAÍZ.

La entrada del K⁺ en la planta tiene lugar por la raíz, absorbiéndose el nutriente a través de los pelos radicales (células epidérmicas especializadas que aumentan la superficie de contacto con la solución del suelo) y a través de las células de la epidermis y del córtex de la raíz (Figura 3). Una vez en la superficie de la raíz, el K⁺ ha de llegar a la estela, para lo cual, atraviesa los tejidos de la raíz camino del xilema por dos posibles rutas (Figura 3): la vía apoplástica, en la que el K⁺ circula por el apoplasto (espacio correspondiente a la parte de la planta fuera de la membrana plasmática, es decir, la pared celular y espacios intercelulares); y la vía simplástica, que transcurre por el simplasto (*continuum* de los citoplasmas interconectados por plasmodesmos, que excluye las vacuolas de las células vegetales). La ruta apoplástica se ve interrumpida al llegar a la endodermis por la banda de Caspary. Esta banda se extiende longitudinalmente alrededor de la estela y está compuesta mayoritariamente por lignina (Barberon, M. y col., 2016), por lo que ejerce la función de barrera hidrofóbica impermeable en la matriz celular, limitando el paso de K⁺ hasta el xilema.

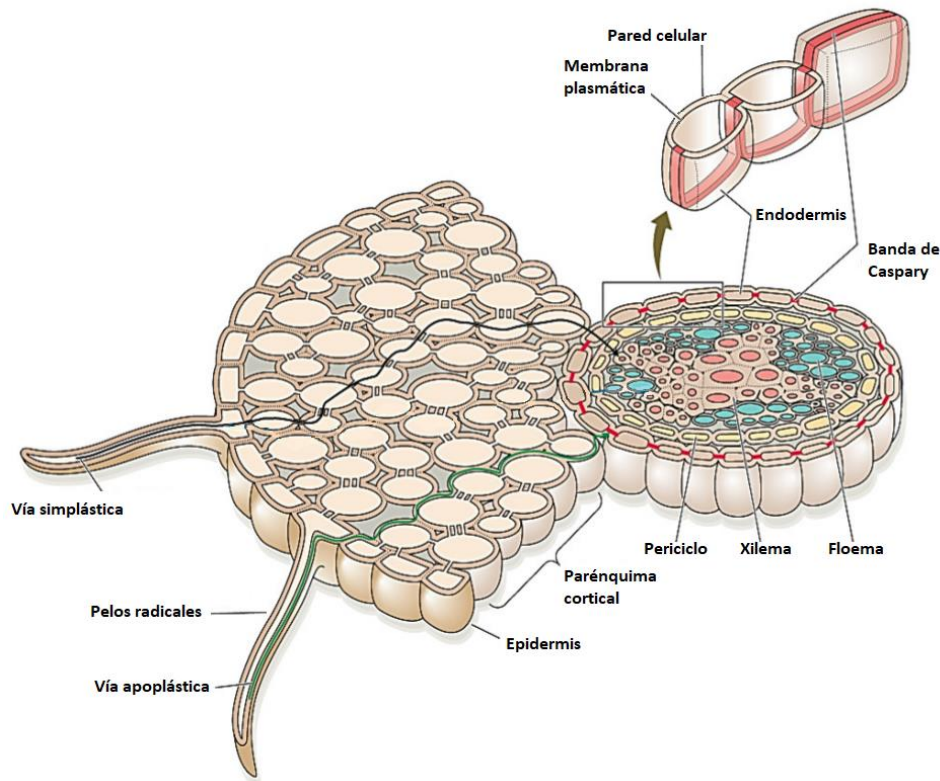


Figura 3. Vías de absorción de sustancias por la raíz. La mayor parte de los solutos y el agua siguen la vía apoplástica (línea de color verde). Los solutos también pueden entrar a través de la vía simplástica (línea de color negra), y para atravesar la banda de Caspary (en rojo), son transportados a través de la membrana plasmática de las células endodérmicas. Figura modificada de Taiz, L.a.Z., Eduardo Zeiger, 2006.

Por tanto, la única posibilidad para que el K^+ llegue a los vasos del xilema es a través de la ruta simplástica, lo que implica que éste tenga que atravesar una membrana plasmática, ya sea en la rizodermis, en el parénquima cortical o en la endodermis. Puesto que la bicapa lipídica es impermeable al K^+ , su entrada en el simplasto debe producirse a través de proteínas de membrana, que constituyen los sistemas de transporte de K^+ .

2.1.1- Modelo de doble sistema.

Hace más de 60 años, Epstein y colaboradores aplicaron el concepto de cinética enzimática para estudiar la absorción de K^+ por la raíz de las plantas de cebada. Usando rubidio (Rb^+) como análogo del K^+ , observaron que la velocidad de absorción exhibía una cinética bifásica en respuesta al incremento en la concentración de K^+ en el medio externo (Epstein, E.

Introducción

y col., 1963) (Figura 4). Estos estudios pusieron de manifiesto que existían, al menos, dos sistemas implicados en la absorción de K^+ .

Cuando la concentración externa era menor de 1 mM, el transporte seguía una cinética de Michaelis-Menten que mostraba una K_m por el K^+ de 21 μ M, se saturaba a concentraciones de K^+ en el rango micromolar y era selectivo por el K^+ y el Rb^+ (Epstein, E. y col., 1963; Epstein, E., 1966). A este tipo de transporte se le denominó “Mecanismo 1”, y posteriormente, sistema de transporte de K^+ de *alta afinidad*. A concentraciones externas superiores a 1 mM, el transporte de K^+ seguía una cinética distinta, que mostraba un valor de K_m de 11,4 mM y era saturable. Este transporte de K^+ se denominó inicialmente “Mecanismo 2” y, más tarde, sistema de transporte de *baja afinidad* (Epstein, E. y col., 1963; Epstein, E., 1966) (Figura 4).

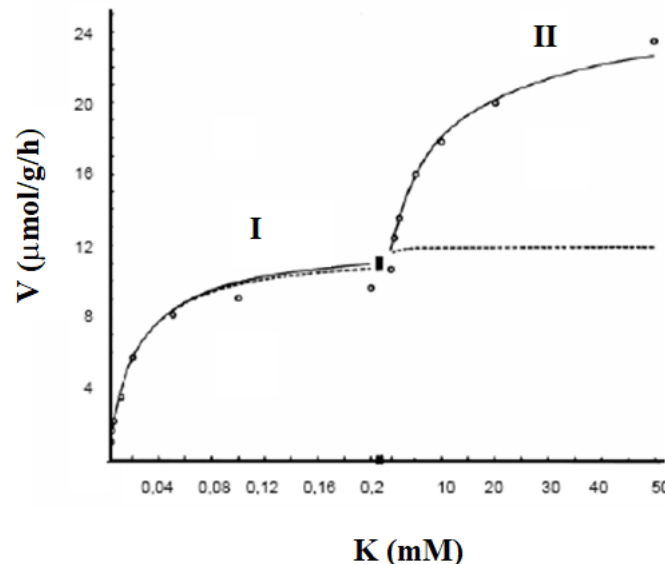


Figura 4. Cinética de absorción del K^+ por raíces de cebada. Se muestra una cinética bifásica en la cual, el “mecanismo 1” (I) sigue una absorción en el rango micromolar denominado sistema de alta afinidad; y el “mecanismo 2” (II), muestra una absorción predominante en el rango de concentraciones milimolar, denominado sistema de baja afinidad. Figura modificada de Epstein, E. y col., 1963.

Estos dos sistemas de transporte se diferencian en el mecanismo por el que se produce el transporte a través de la membrana plasmática y en su regulación. En el transporte de alta afinidad, el K^+ entraría vía simporte con un protón (H^+) de estequiometría 1:1 (Rodríguez-Navarro, A. y col., 1986; Kochian, L.V. y col., 1989; Maathuis, F.J. y Sanders, D., 1994; Maathuis, F.J. y col., 1997b) ,en un proceso dependiente de energía que implicaría la fuerza motriz transmembrana. Por otra parte, en el transporte de baja afinidad, el K^+ sería

transportado a través de canales (tanto específicos de K^+ como no selectivos), cuya actividad depende del gradiente de potencial electroquímico del K^+ . Estos canales están regulados por numerosos factores: el potencial de membrana, el pH, nucleótidos cíclicos, especies reactivas de oxígeno (ROS) y el propio K^+ (Britto, D.T. y Kronzucker, H.J., 2008). Esta cinética bifásica se ha descrito posteriormente en otras especies vegetales y parece ser un modelo universal. En algunas especies como maíz se ha descrito que el componente de baja afinidad es lineal (Kochian y Lucas 1982). Sin embargo, posteriormente se ha descrito que esta observación podía ser debida a la presencia de un flujo apoplástico de gran magnitud que enmascararía un componente saturable de entrada de baja afinidad (Coskun, D. y col., 2016).

Otra diferencia entre ambos sistemas radica en cómo afecta la presencia de otros iones en el medio externo a la absorción de K^+ . El transporte de alta afinidad es sensible a iones competidores como el NH_4^+ o Na^+ mientras que el transporte de baja afinidad parece ser insensible a su presencia (Epstein, E. y col., 1963; Britto, D.T. y Kronzucker, H.J., 2008; Szczerba, M.W. y col., 2009). Se ha demostrado que la presencia de NH_4^+ disminuye enormemente el influjo de K^+ , lo que puede ser debido a una competición directa entre ambos iones (Szczerba, M.W. y col., 2009). En cebada se observó que el Na^+ suprimía el influjo de K^+ a una concentración de éste entre 0,1 y 1,5 mM, sin ser recíproco el efecto del K^+ sobre el influjo de Na^+ (Kronzucker, H.J. y col., 2006).

2.2- PROTEÍNAS RESPONSABLES DEL TRANSPORTE DE K^+ A TRAVÉS DE MEMBRANA EN RAÍCES DE PLANTAS.

En la mayoría de las células, la concentración de K^+ en el citoplasma en condiciones normales se encuentra alrededor de 100 mM (Walker, D.J. y col., 1996; Cuin, T.A. y col., 2003). Sin embargo, la concentración externa de K^+ y los valores de pH a los que están expuestas las distintas células son muy variables (Leigh, R.A. y Wyn Jones, R.G., 1984). Por tanto, no es sorprendente que exista un elevado número de genes que codifiquen canales y transportadores de K^+ con distintas propiedades que permitan el transporte de este catión en presencia de distintas concentraciones, tejidos y tipos de células (Maser, P. y col., 2001; Maser, P. y col., 2002b; Very, A.A. y Sentenac, H., 2002; 2003).

La identificación de los genes implicados en el transporte de K^+ comenzó en los años 90 mediante la complementación funcional en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta

Introducción

levadura posee dos genes, *TRK1* y *TRK2*, que codifican transportadores implicados en la absorción de K^+ , permitiendo su crecimiento a concentraciones micromolares de K^+ externo. El uso de cepas de esta levadura con ambos genes interrumpidos se emplea para el estudio de canales y transportadores de K^+ de plantas mediante complementación funcional.

Desde la identificación del gen *AKT1* que codifica un canal de K^+ en *Arabidopsis* (Sentenac, H. y col., 1992) y el gen *HvHAK1* que codifica un transportador de alta afinidad en cebada (Santa-María, G.E. y col., 1997), se han aislado numerosos genes que codifican sistemas de transporte de K^+ que se clasifican en distintas familias dentro de los canales y de los transportadores de K^+ . Los canales selectivos de K^+ se agrupan en dos familias: *shaker* y TPK (*Tandem-Pore K⁺*). Entre los canales implicados en transporte de K^+ , se consideran también los canales no selectivos de cationes NSCC (*Non Selective Cation Channels*). Los transportadores de K^+ se agrupan en tres familias principales: HAK/KUP/KT (*High-Affinity K⁺/K⁺ Uptake Permease/K⁺ Transporter*), HKT (*High-affinity K⁺ Transport*), y CPAs (*Cation-Proton Antiporters*) (Maser, P. y col., 2001), detallados a continuación.

2.2.1- Canales de K^+

Los estudios electrofisiológicos de las células oclusivas de los estomas, las células parenquimáticas del xilema y de protoplastos de raíz han revelado la presencia de canales específicos de K^+ que son regulados por hiperpolarización y despolarización de la membrana (Lebaudy, A. y col., 2007). Estos canales se han identificado a nivel genético y molecular como multímeros compuestos por subunidades α y β que regulan los gradientes de potencial eléctrico a través de las membranas celulares, donde actúan de manera coordinada con bombas electrogénicas y transportadores de cloruro (Cl^-) (Gradmann, D. y Hoffstadt, J., 1998). También intervienen en los flujos de K^+ de larga distancia a través de los tejidos vasculares (Gaymard, F. y col., 1998; Deeken, R. y col., 2000; Lacombe, B. y col., 2000).

2.2.1.1- Canales de K⁺ tipo *shaker*

Los canales de K⁺ tipo *Shaker* constituyen la familia mejor caracterizada. Son canales tetraméricos compuestos por 4 subunidades α , situadas alrededor de un poro central (Zimmermann, S. y Sentenac, H., 1999). Cada subunidad está constituida por 6 segmentos hidrofóbicos transmembrana, con una región de aminoácidos cargados positivamente en el cuarto segmento, que actúa como sensor de voltaje y un dominio poro entre el quinto y sexto segmento, que contiene un motivo altamente conservado, GYGD (glicina-tirosina-glicina-aspartato), clave para la selectividad del K⁺ (Very, A.A. y Sentenac, H., 2003).

Estos canales se expresan en la membrana plasmática de varios tipos de células, mediando la mayor parte de las corrientes selectivas de K⁺ dependientes de potencial de membrana (Very, A.A. y Sentenac, H., 2002). Se agrupan en tres subfamilias en base a su dependencia del potencial de membrana: los canales rectificadores de entrada activados por hiperpolarización (*'Inward-Rectifying Shaker K⁺ Channels'*), que incluyen a AKT1, KAT1 y KAT2; los canales débilmente rectificadores (*'weakly rectifying'*), AKT2/3; y los canales rectificadores de salida activados por despolarización (*'Outward-Rectifying Shaker K⁺ Channels'*), donde se encuentran los canales GORK y SKOR (Lebaudy, A. y col., 2007).

La subfamilia de canales rectificadores de entrada incluye los primeros canales de K⁺ aislados en plantas, los canales AKT1 y KAT1 de *Arabidopsis*, ambos identificados mediante complementación funcional en una levadura mutada en TRK1 (Schachtman, D.P. y col., 1992; Sentenac, H. y col., 1992). Posteriormente, se aisló el canal KAT2 (Butt, A.D. y col., 1997). Los canales KAT1 y KAT2 son específicos de las células oclusivas y están implicados en el transporte de K⁺ que regula la apertura estomática (Szyroki, A. y col., 2001).

Los canales débilmente rectificadores, AKT2/3, se encuentran localizados en las células del floema y permiten el transporte de K⁺ de forma bidireccional, participando en la carga y descarga del floema y en la adquisición de K⁺ por las células del mesófilo de la hoja (Deeken, R. y col., 2000; Dennison, K.L. y col., 2001).

Los canales de rectificación de salida, GORK y SKOR, se activan por despolarización de la membrana. El canal SKOR se expresa en el cilindro vascular de la raíz, donde media el vertido de K⁺ al xilema para ser transportado desde la raíz hasta la parte aérea (Gaymard, F. y col., 1998). El canal GORK constituye el principal canal rectificador de salida en las células oclusivas,

Introducción

eliminando rápidamente el K^+ de las mismas durante el cierre estomático (Ache, P. y col., 2000).

2.2.1.2- Canales de K^+ TPK ('Tandem-Pore K^+ Channels').

El primer miembro de esta familia fue identificado en 1997 mediante aproximaciones *in silico*, utilizando un programa de secuenciación de genes de Arabidopsis. Los transportadores TPK se caracterizan por poseer entre 2 y 8 dominios transmembrana, y un dominio poro, o más frecuentemente, dos dominios poro separados por dos dominios transmembrana, con la secuencia conservada GYGD (Zimmermann, S. y Sentenac, H., 1999; Maser, P. y col., 2001; Maser, P. y col., 2002b) (Lebaudy, A. y col., 2007; Ashley, M.K. y col., 2006; Czempinski, K. y col., 1999). Esta familia comprende 6 miembros: TPK1-5 y KCO3. Inicialmente, el canal KCO3 se clasificó en una familia denominada canales K_{ir} ('*inward-rectifying*') (Czempinski, K. y col., 1999), pero los análisis filogenéticos posteriores consideraron a los canales K_{ir} pertenecientes a la familia TPK, por lo que ya no constituyen una familia separada (Gomez-Porras, J.L. y col., 2012; Marcel, D. y col., 2010) (Voelker, C. y col., 2010). Los canales TPK se localizan en la membrana vacuolar (Czempinski, K. y col., 2002; Schonknecht, G. y col., 2002) a excepción de TPK4, que se localiza en la membrana plasmática (Becker, D. y col., 2004; Dunkel, M. y col., 2008). El canal TPK3, además de en la membrana vacuolar, se localiza en la membrana de los tilacoides (Zanetti, M. y col., 2010), donde contribuye a la electroneutralidad necesaria en el lumen de los tilacoides tras la acidificación inducida por la luz (Carraretto, L. y col., 2013). El canal TPK1 está implicado en la homeostasis del K^+ , participando en la osmorregulación, movimiento de estomas y germinación (Gobert, A. y col., 2007); mientras que TPK4 participa en el transporte de K^+ en el grano de polen y en el tubo polínico (Becker, D. y col., 2004).

2.2.1.3- Canales de cationes no selectivos (NSCC)

Esta familia de canales constituye un grupo heterogéneo que incluye canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGCs) y canales tipo *shaker* (Demidchik, V. y Maathuis, F., 2007). Se encuentran tanto en membrana plasmática como en endomembranas, fundamentalmente en tonoplasto. Estos canales muestran alta selectividad de cationes sobre aniones, pero no discriminan fuertemente entre cationes (Demidchik, V. y col., 2002). Contribuyen a la

adquisición de K^+ de baja afinidad, pudiendo ser activados por un gran número de factores; y se clasifican según se activen por hiperpolarización, despolarización o ser insensibles al voltaje. También pueden ser mecanosensibles o activados por calcio (Ca^{2+}), por nucleótidos cíclicos o por glutamato (Demidchik, V. y col., 2002).

Las proteínas CNGCs se activan por AMPc o por GMPc (Leng, Q. y col., 2002), provocando la entrada de cationes a la célula (Balague, C. y col., 2003). Estos canales están constituidos por 6 dominios transmembrana y un dominio poro localizado entre la quinta y la sexta unidad transmembrana, que no presenta la secuencia GYGD. El dominio a través del cual se une el nucleótido cíclico está localizado en el extremo carboxilo terminal junto con el dominio de unión a calmodulina (Maser, P. y col., 2001; Very, A.A. y Sentenac, H., 2002). Son canales no selectivos, con baja discriminación entre el K^+ y el Na^+ (Balague, C. y col., 2003), que se expresan en la membrana celular (Arazi, T. y col., 1999) de todos los tejidos de la planta (Talke, I.N. y col., 2003). Están implicados en numerosas funciones, que abarcan desde la señalización celular (Very, A.A. y Sentenac, H., 2002) a la adquisición de cationes a través de la raíz (Maathuis, F.J. y Sanders, D., 2001).

Las subunidades de los canales tipo *shaker* de la familia NSCC pueden formar heterómeros, proporcionándoles la capacidad de llevar a cabo numerosas funciones (Lebaudy, A. y col., 2007).

2.2.2- Transportadores de K^+

Los genes identificados que codifican transportadores de K^+ en el genoma de Arabidopsis se clasifican en 3 familias principales: HAK/KUP/KT, HKT y CPA (Maser, P. y col., 2001).

2.2.2.1- Transportadores HAK/KUP/KT

Las proteínas de la familia HAK/KUP/KT pertenecen a la superfamilia de transportadores APC (*Amino acid-Polyamine-organo Cation*) y están implicadas en el transporte de K^+ a través de la membrana en procariotas, hongos y plantas, participando no sólo en la adquisición de K^+ y translocación, sino también en la adaptación a estreses, regulación del potencial osmótico, así como en el control de la morfología de la raíz. Basados en su homología con los

Introducción

transportadores KUP de bacterias y HAK de hongos, los primeros transportadores en plantas se clonaron en cebada (Santa-María, G.E. y col., 1997) y *Arabidopsis* (Quintero, F.J. y Blatt, M.R., 1997; Kim, E.J. y col., 1998; Fu, H.H. y Luan, S., 1998). Nieves-Cordones, M. y col., (2016) llevaron a cabo un análisis filogenético de la familia HAK/KUP/KT con 913 secuencias identificadas en 46 genomas de angiospermas (Nieves-Cordones, M. y col., 2016) (Figura 5), donde establecieron que las funciones de los miembros de esta familia puede variar sustancialmente entre especies.

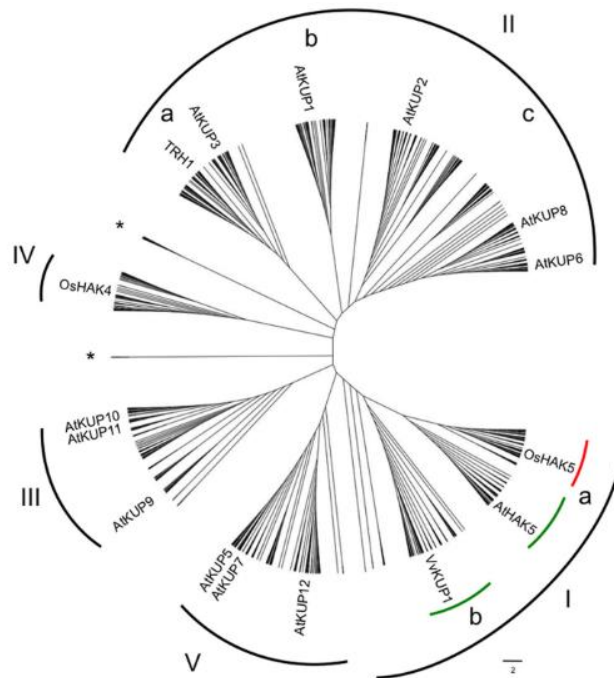


Figura 5. Árbol filogenético de la familia de transportadores HAK/KUP/KT en plantas. Presenta 913 secuencias identificadas en 46 genomas, y 3 grupos externos (*Picea abies*, *Selaginella moellendorffii* y *Physcomitrella patens*). Las secuencias se distribuyen en 5 clados (I-V) y sub-clados. El clado I contiene únicamente secuencias de especies dicotiledóneas (líneas verdes) y monocotiledóneas (línea roja). Los asteriscos representan las secuencias externas, que no se agruparon en ningún clado. Las letras representan los sub-clados dentro de los clados I y II. Se muestran las especies más representativas de cada clado. Figura de (Nieves-Cordones, M. y col., 2016).

Los estudios de localización han puesto de manifiesto que estos transportadores están presentes en todos los tejidos de la planta (Serrano, R. y Rodríguez-Navarro, A., 2001; Bañuelos, M.A. y col., 2002). Los análisis funcionales han mostrado que algunos miembros de la familia están implicados en la adquisición de K^+ en el rango de alta afinidad, particularmente en condiciones de ayuno de K^+ (Gierth, M. y Maser, P., 2007); otros miembros también llevarían a cabo transporte de K^+ de baja afinidad (Fu, H.H. y Luan, S., 1998; Vallejo, A.J., 2005).

Los transportadores de esta familia están presentes en los genomas de todas las plantas conocidas, pero no en células animales (Corratgé-Faillie, C. y col., 2010). Los estudios de hidrofobicidad predicen que las proteínas de la familia HAK/KUP/KTT tendrían entre 10 y 14 dominios transmembrana (Gierth, M. y Maser, P., 2007).

2.2.2.2- Transportadores HKT

Las proteínas HKT de plantas pertenecen a una familia de transportadores específicos de células no animales, la familia Trk/Ktr/HKT (*'Transporter of K⁺'*, en hongos y bacterias; *'K⁺ Transporter'* en bacteria; y *'High-affinity K⁺ Transport'*, en plantas). Estos transportadores están implicados en el transporte y homeostasis de Na⁺ y K⁺, y se han identificado muchos genes como miembros de esta familia (Hauser, F. y Horie, T., 2010; Horie, T. y col., 2009; Munns, R. y Tester, M., 2008), llevando a cabo diversas funciones que incluyen: la adquisición de K⁺ o Na⁺, el control del potencial de membrana, la adaptación al estrés osmótico y salino, recirculación del Na⁺ desde la parte aérea a las raíces, etc. (Corratgé-Faillie, C. y col., 2010; Haro, R. y col., 2010). Todos los transportadores HKT son permeables al Na⁺, por lo que las investigaciones en esta familia se han centrado en su implicación en la adaptación a ambientes salinos más que en su papel en la nutrición de K⁺. Los transportadores HKT de la Clase I (HKT1.X), que constituyen el tipo predominante de esta familia, muestran mayor permeabilidad al Na⁺, promoviendo la translocación de este catión al xilema y su exclusión de las hojas en Arabidopsis, arroz y trigo (Byrt, C.S. y col., 2007; Davenport, R.J. y col., 2007; Huang, S. y col., 2006; Moller, I.S. y col., 2009; Maser, P. y col., 2002a; Munns, R. y col., 2012; Ren, Z.H. y col., 2005; Sunarpi y col., 2005; Schroeder, J.I. y col., 2013). La Clase II de transportadores HKT (HKT2.X), contiene miembros que han sido identificados únicamente en monocotiledóneas, y parecen mediar el co-transporte Na⁺-K⁺ (Schachtman, D.P. y Schroeder, J.I., 1994; Rubio, F. y col., 1995; Yao, X. y col., 2010; Gassmann, W. y col., 1996; Horie, T. y col., 2001; Haro, R. y col., 2005; Oomen, R.J.F.J. y col., 2012).

2.2.2.3- Antiportadores Cation-Protón (CPAs)

Las proteínas que constituyen esta familia se caracterizan por contener un dominio Na^+/H^+ 'exchanger', y pueden clasificarse en dos subfamilias: CPA1, constituida por los tipos de transportadores NHX y SOS; y CPA2, constituida por los transportadores del tipo CHX y KEA. Estos transportadores son ubicuos en plantas, hongos, animales y bacterias; y a su vez se subdividen, estando algunas de las subfamilias restringidas a reinos particulares.

Los antiportadores CPAs operan de un modo electroneutro, sin afectar a la diferencia de potencial eléctrico de la membrana. Ajustan los gradientes de concentración de los cationes y protones, por lo que sus funciones estarían orientadas al mantenimiento de la homeostasis de cationes monovalentes y la regulación del pH (Gierth, M. y Maser, P., 2007).

Los transportadores pertenecientes a la subfamilia CPA1 fueron inicialmente caracterizados como antiportadores Na^+/H^+ intracelulares y de membrana plasmática (Brett, C.L. y col., 2005). Posteriormente, se ha demostrado que alguna de estas proteínas puede transportar K^+ , como es el caso de AtNHX1 (Venema, K. y col., 2002).

La subfamilia CPA2 en Arabidopsis está constituida por 28 transportadores CHX y 6 transportadores KEA (Maser, P. y col., 2001; Sze, H. y col., 2004). Algunos miembros de la subfamilia CPA2 pueden codificar transportadores K^+/H^+ . De los 28 genes de la familia CHX identificados, 18 se expresan específicamente durante la microgametogénesis o en tejido esporofítico, lo que sugiere que las proteínas podrían estar implicadas en la homeostasis del K^+ durante el desarrollo y la germinación del polen (Sze, H. y col., 2004). También se ha descrito la actuación de numerosos CHX en la homeostasis del pH (Chanroj, S. y col., 2012).

Los 6 genes KEA fueron identificados mediante homología con antiportadores K^+/H^+ bacterianos, y se separan en dos grupos distintos: KEA1-KEA3, estrechamente relacionados con los transportadores de salida de K^+ regulados por glutatión, KefB y KefC, que poseen un dominio intercambiador Na^+/H^+ y un dominio KTN ('*K⁺ Transport Nucleotide binding*'); y el grupo KEA4-KEA6, que contienen un dominio intercambiador Na^+/H^+ y comparten homología con las proteínas de hongos ScNha1 y SpSOD2 (Sze, H. y col., 2004; Brett, C.L. y col., 2005). Estos transportadores parecen mediar la supervivencia al estrés provocando sulfhidrilos electrofílicos (Booth, I.R. y col., 1985; Booth, I.R. y col., 2003; Ferguson, G.P. y col., 1997; Miller, S. y col., 1997). Estudios recientes describen la participación de los transportadores KEA1 y KEA2 de Arabidopsis en el desarrollo temprano de los cloroplastos y de KEA3 en la

regulación de la fotosíntesis, mediante el eflujo de H^+ desde el lumen del tilacoide al estroma, a través del intercambio K^+/H^+ , lo que regula la fotosíntesis (Kunz, H.H. y col., 2014; Wang, C.J. y col., 2017).

2.3- RELEVANCIA FISIOLÓGICA DEL TRANSPORTADOR HAK5 Y DEL CANAL AKT1 EN LA ABSORCIÓN DE K^+ .

La relevancia fisiológica de los transportadores de tipo HAK y de los canales AKT1 en la absorción de K^+ por la raíz se estableció en un principio de manera indirecta. La comparación de las características del transporte de K^+ mediado por estos sistemas en organismos heterólogos y los patrones de expresión de los genes que los codifican, junto con las características cinéticas y farmacológicas del transporte en la planta, permitió establecer hipótesis sobre su función (Epstein, E. y col., 1963; Epstein, E., 1966; Sentenac, H. y col., 1992; Rodriguez-Navarro, A. y col., 1986; Maathuis, F.J. y Sanders, D., 1994; Maathuis, F.J. y col., 1997a; Santa-María, G.E. y col., 1997). Sin embargo, la demostración de la contribución de cada sistema a la absorción de K^+ no fue posible hasta la utilización de líneas de inserción de T-ADN e inhibidores selectivos en la planta modelo *Arabidopsis* (Hirsch, R.E. y col., 1998; Spalding, E.P. y col., 1999; Gierth, M. y col., 2005; Rubio, F. y col., 2008; Qi, Z. y col., 2008; Nieves-Cordones, M. y col., 2010; Pyo, Y.J. y col., 2010; Rubio, F. y col., 2010).

Los estudios con líneas de inserción T-ADN mostraron que el transportador de K^+ de alta afinidad AtHAK5 es el único sistema que media la absorción de K^+ a concentraciones externas menores a 10 μM (Qi, Z. y col., 2008; Nieves-Cordones, M. y col., 2010; Rubio, F. y col., 2010) (Figura 6). A concentraciones más altas, la absorción de K^+ también es llevada a cabo por el canal AKT1, siendo ambos los principales sistemas de absorción de K^+ cuando las concentraciones externas se encuentran entre 10 y 200 μM (Rubio, F. y col., 2010) (Figura 6).

A concentraciones externas superiores a 500 μM , la función de AtHAK5 no es relevante, siendo la contribución de AKT1 fundamental para la absorción de K^+ (Figura 6). A estas concentraciones, la línea *akt1* muestra un crecimiento menor en comparación con la línea silvestre (WT) y con *athak5*, las cuales crecen de forma similar (Rubio, F. y col., 2010). Los estudios con las líneas de inserción de T-ADN además han permitido demostrar que el transportador HAK5 es sensible a NH_4^+ , mientras que AKT1 lo es a Ba^{2+} .

Introducción

Los estudios con la línea doble mutante *athak5 atakt1* han mostrado que este mutante no absorbe Rb^+ a concentraciones menores a $100 \mu\text{M}$, lo que demuestra que AtHAK5 y AKT1 son los únicos responsables de la absorción de K^+ en el rango de absorción de K^+ de alta afinidad (Alemán, F. y col., 2011).

A concentraciones superiores a $100 \mu\text{M}$, otros sistemas no identificados estarían llevando a cabo la absorción de K^+ en el doble mutante *athak5 atakt1*. Sin embargo, la absorción de K^+ a estas concentraciones no es suficiente para permitir un crecimiento normal de la planta, ya que las plantas *athak5 atakt1* muestran una menor absorción de K^+ , menor biomasa y menores concentraciones de K^+ tisulares que la silvestres, por lo que AKT1 sería el sistema más importante en la adquisición de K^+ a estas concentraciones.

A 10 mM , otros sistemas son capaces de absorber suficiente K^+ para permitir un crecimiento normal en el doble mutante, ya que en estas condiciones el doble mutante no presenta un fenotipo diferente a WT (Rubio, F. y col., 2010).

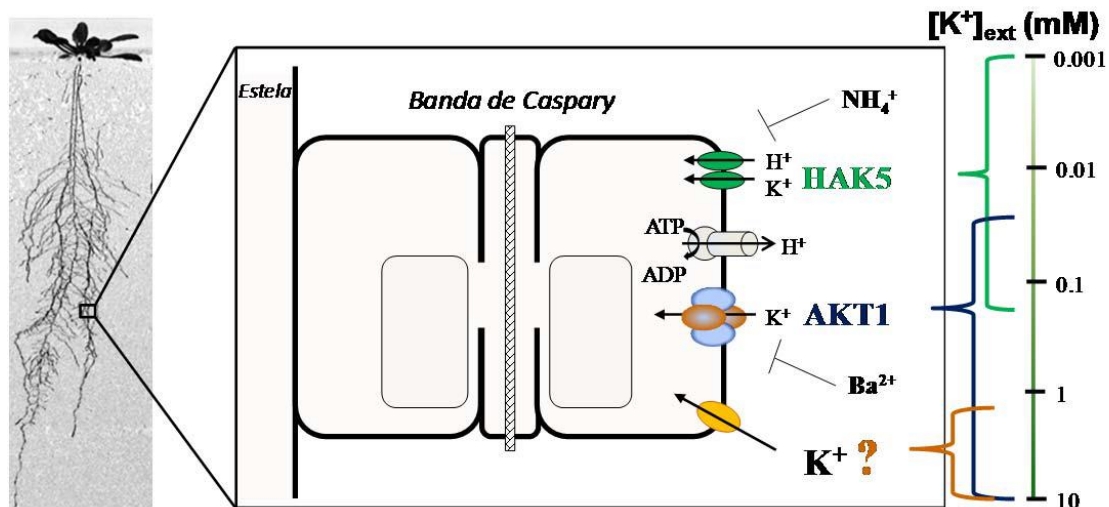


Figura 6. Adquisición de K^+ por la raíz de Arabidopsis. A concentraciones menores de $10 \mu\text{M}$, AtHAK5 es el único sistema implicado en la absorción de K^+ ; a mayores concentraciones, AKT1 también participa en esta absorción, siendo ambos sistemas los responsables de la absorción a concentraciones entre 100 y $200 \mu\text{M}$. A concentraciones superiores de $500 \mu\text{M}$, AKT1 es el único sistema encargado de la absorción. AtHAK5 es sensible a NH_4^+ y AKT1 a Ba^{2+} . En ausencia de AtHAK5 y AKT1, existen sistemas no identificados que permiten la absorción de K^+ y el crecimiento de la planta a concentraciones mayores de 1 mM . Figura de Alemán, F. y col., 2011.

Varios estudios sugieren que los sistemas candidatos a llevar a cabo la absorción de K^+ en las plantas *athak5 atakt1* podrían pertenecer a la familia de CNGCs (Li, X. y col., 2005; Kaplan,

B. y col., 2007), a la familia CHX (Zhao, J. y col., 2008), o a la familia de canales regulados por glutamato (GLR) (Dietrich, P. y col., 2010; White, P.J. y Karley, A.J., 2010). Se ha visto que el transportador AtKUP7, perteneciente a la familia HAK/KUP/KT, está implicado en la absorción de K^+ a concentraciones superiores a 500 μM (Han, M. y col., 2016), por lo que también se considera un posible candidato a constituir el sistema diferente a AtHAK5 y AKT1 implicado en la absorción de K^+ a concentraciones externas inferiores a 10 mM.

2.4- FACTORES QUE AFECTAN A LA NUTRICIÓN DE K^+ .

La deficiencia de K^+ en plantas puede ser consecuencia de una menor concentración del nutriente en la solución de absorción o de una baja movilidad del nutriente desde la misma. La movilidad del nutriente desde la solución de absorción viene determinada por numerosos factores que incluyen: el pH y temperatura de la solución (Jungk, A., 2001), así como la presencia de químicos en la solución de absorción, que pueden competir con el K^+ por la unión a los canales y transportadores de K^+ para su absorción por las raíces de las plantas (Epstein, E. y Hagen, C.E., 1952), como los iones sodio (Na^+) y cesio (Cs^+). Debido a su relevancia en esta Tesis Doctoral, a continuación, se detalla el efecto de la presencia de estos iones sobre la absorción de K^+ por las plantas.

2.4.1- Presencia de Na^+ .

La salinidad, originada fundamentalmente por altas concentraciones de NaCl, es un importante estrés abiótico para las plantas, afectando aproximadamente un 7% de la superficie total dedicada a agricultura (Munns, R., 2005), lo que supone grandes pérdidas en la producción de cultivos. Los avances en el estudio de la tolerancia a la salinidad de las plantas han revelado que la capacidad para mantener un ratio K^+/Na^+ citosólico alto es uno de los factores clave de la tolerancia de las plantas a la salinidad (Shabala, S. y Cuin, T.A., 2008).

El K^+ y el Na^+ son dos elementos estructural y químicamente muy parecidos pero no pueden ser intercambiados para la nutrición de las plantas (Benito, B. y col., 2014). Las estimaciones estructurales dan un valor de radio de 1.16 Å a 1.38 Å para el K^+ ; y de 1.01 Å a 1.16 Å para el Na^+ , por lo que el tamaño del K^+ es de aproximadamente 1.3 veces el del Na^+ . En

Introducción

los procesos biológicos, es importante tener en cuenta la interacción de los iones con las moléculas de agua, lo que cambia la estimación del tamaño. Así, el K^+ hidratado tiene un radio de 331 pm, mientras que el del Na^+ es de 358 pm (Volkov, A.G. y col., 1997). Debido a esta diferencia de tamaño entre los cationes cuando están hidratados, las funciones del K^+ en la planta (ver apartado 1.1) no pueden ser llevadas a cabo por el Na^+ (Tester, M. y Davenport, R.J., 2003; Marschner, P., 2012).

Las altas concentraciones de Na^+ características de los suelos salinos pueden conducir a deficiencias de K^+ (Botella, M.A. y col., 1997; Carden, D.E. y col., 2003; Shabala, S. y col., 2006). Esto es debido a varias causas. Por una parte, producen una despolarización de la membrana plasmática de las células de la raíz (Shabala, S. y col., 2003; Shabala, S. y col., 2006; Nieves-Cordones, M. y col., 2008), lo que disminuye la fuerza motriz del K^+ además de inactivar los canales rectificadores de entrada de K^+ , como AKT1 (Anschütz, U. y col., 2014). Por otra parte, las altas concentraciones de Na^+ dan lugar a la inhibición de la entrada de K^+ a través de los distintos sistemas de entrada del nutriente, ya que al ser ambos cationes muy similares químicamente, se pueden producir efectos de inhibición competitiva del transporte (Cheeseman, J.M., 1982; Schachtman, D.P. y Schroeder, J.I., 1994; Rubio, F. y col., 1995; Kronzucker, H.J. y col., 2008; Gassmann, W. y col., 1996; Kronzucker, H.J. y col., 2006; Santa-María, G.E. y col., 1997; Maathuis, F.J.M. y Sanders, D., 1996; Nieves-Cordones, M. y col., 2007; Martínez-Cordero, M.A. y col., 2005). Por último, la presencia de altas concentraciones de Na^+ durante un período largo de tiempo, reprimen la expresión de los transcritos de transportadores HAK asociada a bajas concentraciones de K^+ externas (Nieves-Cordones, M. y col., 2008; Alemán, F. y col., 2009b; Nieves-Cordones, M. y col., 2010).

Por tanto, en condiciones de bajo K^+ y alto Na^+ , las plantas no disponen de los mecanismos de absorción de K^+ activos, lo que lleva a la planta a una situación de deficiencia de K^+ , que junto a la acumulación de Na^+ , resulta en una disminución de la ratio K^+/Na^+ citosólica. En conjunto se produce una disminución del crecimiento de la planta ya que el incremento de los contenidos celulares de Na^+ afecta la disponibilidad, transporte y distribución de agua y nutrientes minerales necesarios para la planta (Shabala, S. y Cuin, T.A., 2008; Maathuis, F.J.M. y Amtmann, A., 1999).

2.4.2- Presencia de Cs⁺.

El Cs⁺ pertenece al Grupo I de metales alcalinos, por lo que comparte similitudes químicas con los metales alcalinos de este grupo, en particular con el K⁺ (Bowen, H.J.M., 1979). A pesar de las similitudes, el Cs⁺ no sólo no es requerido para la nutrición de los seres vivos, sino que puede llegar a ser tóxico (White, P.J. y Broadley, M.R., 2000).

Hay 21 isótopos de Cs, de masa atómica entre 123 y 144 (Davis, J.J., 1963). El único isótopo natural del Cs⁺ es el isótopo estable ¹³³Cs. De los 7 isótopos radiactivos del Cs, el ¹³⁴Cs y el ¹³⁷Cs son de gran importancia medioambiental debido a su rápida incorporación a los sistemas biológicos, a su larga vida media y a las radiaciones α y β que emiten en su desintegración. Ambos radioisótopos están presentes en los elementos combustibles irradiados por reactores nucleares durante muchos años y en la estratosfera debido a las explosiones nucleares ocurridas entre 1952 y 1963 (Bell, J.N.B. y col., 1988).

Tras los accidentes de las plantas nucleares de Chernobyl en 1986 y de Fukushima en 2011, la contaminación por radiocesio amenaza a la agricultura de las áreas afectadas (Nagao, S. y col., 2013; White, P.J. y Broadley, M.R., 2000; Yasutaka, T. y col., 2014). Aunque la concentración de radiocesio es muy baja, por debajo del rango micromolar (White, P.J. y Broadley, M.R., 2000), la mayoría se concentra en la primera capa del suelo (Lepage, H. y col., 2015), afectando a los cultivos.

La principal ruta de entrada de ¹³⁴Cs y ¹³⁷Cs a la cadena alimenticia es a través de la absorción por las plantas (Bell, J.N.B. y col., 1988), por lo que las características de dicha absorción determinan su potencial para la fitoremediación o su cultivo en suelos contaminados por estos radioisótopos.

Debido a la permeabilidad al Cs⁺ de muchos transportadores de K⁺ (White, P.J. y Broadley, M.R., 2000), la absorción de K⁺ puede verse afectada en presencia de este catión (Epstein, E. y Hagen, C.E., 1952; Sheahan, J.J. y col., 1993b; Maathuis, F.J. y Sanders, D., 1996; White, P.J. y Broadley, M.R., 2000; Adams, E. y col., 2013). En Arabidopsis, el mecanismo por el cual se absorbe el Cs⁺ en condiciones de bajo K⁺ externo, lo constituye el transportador de K⁺ de alta afinidad AtHAK5 (Qi, Z. y col., 2008). Algunos miembros de la familia CNGCs también podrían estar involucrados en la absorción de Cs⁺ por las raíces de Arabidopsis (Kanter, U. y col., 2010).

Introducción

Por todo esto, determinar las vías de entrada de Cs^+ en la planta y en particular la contribución de los sistemas de absorción de K^+ a dicha entrada resulta de gran interés para desarrollar estrategias de fitoremediación o limitar la acumulación de Cs^+ y sus isótopos en los cultivos.

3- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS A LA DEFICIENCIA DE K^+ .

3.1- MECANISMOS DE DETECCIÓN Y SEÑALIZACIÓN EN RESPUESTA A LA DEFICIENCIA DE K^+ .

Debido a que las plantas no se pueden mover, para evitar los estreses producidos en su ambiente, han desarrollado sistemas de detección y adaptación que les permiten sobrevivir en condiciones de bajo K^+ externo. Las raíces de las plantas son los principales órganos que contactan directamente con el suelo, por lo que una deficiencia de K^+ se detecta en primer lugar en las células de la raíz. En concreto, la primera señal es percibida en la membrana plasmática de las células de la epidermis, y después es transmitida al citoplasma.

Tras ser percibida, las células ponen en marcha una serie de reacciones bioquímicas y fisiológicas que incluyen respuestas a corto y largo plazo. La respuesta 'corta' tiene lugar unas pocas horas después e implica la generación de señales moleculares que son traducidas y dan lugar a una cascada de moléculas específicas. Estos mensajeros son detectados y generan cambios en la expresión de genes, en el metabolismo y en la fisiología, que tienen como consecuencia final la adaptación de la planta a la deficiencia de K^+ . Cuando el estrés por bajo K^+ continúa durante días y la concentración de K^+ citoplasmática se reduce de manera significativa, se pone en marcha la respuesta 'larga', que resulta en cambios metabólicos (Amtmann, A. y Blatt, M.R., 2009; Armengaud, P. y col., 2009) y morfológicos (Hodge, A., 2004) de la planta.

3.1.1-Potencial de membrana plasmática.

El potencial de membrana plasmática constituye la principal fuerza motriz para la absorción de K^+ desde el suelo en contra de su gradiente de concentración. El potencial de membrana se genera por la ATPasa de H^+ que consumiendo ATP bombea H^+ al exterior creando una diferencia de potencial eléctrico, negativo en el interior, y un gradiente de pH, ácido en el exterior. Además, el potencial de membrana se ve afectado de forma importante por la concentración de K^+ externa (Maathuis, F.J.M. y Sanders, D., 1993b). Cuando la concentración de K^+ externa es baja, se produce una hiperpolarización del potencial de membrana (Schroeder, J.I. y col., 1994; Marten, I. y col., 1999; Nieves-Cordones, M. y col., 2008) mientras que a concentraciones altas, se origina una despolarización (Spalding, E.P. y col., 1999). El potencial de membrana podría actuar como una señal de detección ante situaciones de deficiencia de K^+ , ya que la hiperpolarización tiene lugar a los pocos minutos del descenso en la concentración externa de K^+ (Schroeder, J.I. y col., 1994; Marten, I. y col., 1999; Nieves-Cordones, M. y col., 2008).

3.1.2-Especies reactivas de oxígeno.

Las alteraciones en los procesos metabólicos producidas por estrés dan lugar a un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés '*Reactive Oxygen Species*'), en el interior celular, provocando daños oxidativos debido a su carácter altamente reactivo, como la peroxidación de componentes celulares (Apel, K. y Hirt, H., 2004).

Sin embargo, los radicales libres también actúan como mensajeros, transmitiendo señales intra e intercelulares, en multitud de procesos metabólicos (Mittler, R., 2017; Zhu, J.K., 2016). Juegan un papel importante en muchos mecanismos implicados en la transducción de señales, mediando respuestas a infección por patógenos, estrés abiótico, regulación del desarrollo, así como en la muerte celular programada (PCD, del inglés '*Programmed Cell Death*') en diferentes tipos celulares (Apel, K. y Hirt, H., 2004; Beers, E.P. y Mcdowell, J.M., 2001).

Las deficiencias nutricionales en plantas, tanto de K^+ como de nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) y de sulfato (SO_4^{2-}) inducen la acumulación de ROS en las células vegetales de la raíz (Shin, R. y col., 2005; Schachtman, D.P. y Shin, R., 2007; Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004).

Introducción

La generación de ROS por las plantas se lleva a cabo mediante la activación de varias oxidasas y peroxidasas (Allan, A.C. y Fluhr, R., 1997; Bolwell, G.P. y col., 2002). Las NADPH oxidasas son complejos enzimáticos de membrana plasmática, denominadas en plantas como RBOH (*'Respiratory Burst Oxidase Homologs'*), que se activan mediante un espectro de señales reguladoras, iniciando un proceso de producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Apel, K. y Hirt, H., 2004; Bindschedler, L.V. y col., 2006). La NADPH oxidasa RBOHC estaría implicada en la producción de ROS en la señalización de bajo K^+ en raíces de *Arabidopsis* (Shin, R. y col., 2005) y también la NADPH oxidasa RHD2 sería responsable de la producción de H_2O_2 implicado en la regulación de la expresión de diferentes genes involucrados en la respuesta a la deficiencia de K^+ entre los que se encuentra el gen que codifica para el transportador de K^+ de alta afinidad, *AtHAK5* (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004) (ver más adelante, apartado 3.2.1).

La deficiencia de K^+ promueve la inducción de *RCI3* (*Rare Cold Inducible gene 3*), gen que codifica a un miembro de la familia de peroxidasas de tipo III, implicado en la generación de ROS en las raíces de *Arabidopsis* (Kim, T.-H. y col., 2010). Además, la producción de ROS por esta peroxidasa también estaría implicada en la señalización de la inducción del gen *AtHAK5* en condiciones de bajo K^+ .

La producción de ROS también es importante para la generación de una señal de Ca^{2+} (ver apartado siguiente, 3.1.3), debido a que activan canales permeables a Ca^{2+} (Demidchik, V. y Maathuis, F., 2007).

3.1.3-Señalización por Ca^{2+} .

A parte de su papel en el crecimiento y desarrollo de la planta como nutriente, el Ca^{2+} constituye uno de los más importantes mensajeros implicados en la transducción de señales en la respuesta celular a numerosos estreses (Kudla, J. y col., 2010). Las variaciones de su concentración en el citoplasma celular modulan multitud de procesos metabólicos relacionados con la respuesta a estímulos. En condiciones normales, el Ca^{2+} se encuentra en el citoplasma en una concentración en torno a 200 nM (Bush, D.S., 1995), pero es modificada por diferentes estímulos a través de la entrada desde el apoplasto o por liberación desde orgánulos como el retículo endoplasmático o la vacuola (Sanders, D. y col., 1999; Bush, D.S., 1995; Knight, H., 2000).

El incremento del Ca^{2+} citoplasmático es transitorio y la reabsorción de este catión se encuentra finamente regulada tanto temporal como espacialmente (Zhu, J.K., 2016), lo que permite que se pueda controlar la naturaleza, intensidad y duración de la señal (Mcainsh, M.R. y Hetherington, A.M., 1998). Entre las proteínas implicadas en su liberación al citoplasma se han descrito canales mecano-sensibles como OSCA1 o MSL8 (Yuan, F. y col., 2014; Hamilton, E.S. y col., 2015).

Las NADPH oxidasas localizadas en la membrana plasmática producen ROS extracelulares que directamente activan canales permeables a Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática (Demidchik, V. y col., 2007). Uno de estos canales activados por ROS identificados en las células de las raíces de *Arabidopsis* se corresponde con las proteínas de membrana denominadas anexinas (Laohavisit, A. y col., 2012). Alternativamente a estos sistemas, las familias de proteínas CNGC y GRL (del inglés, *Glutamate Receptor-Like*) podrían mediar la liberación de Ca^{2+} regulada por voltaje o señalización bioquímica (Zhu, J.K., 2016; Swarbreck, S. y col., 2013).

La reabsorción de Ca^{2+} se produce mediante su unión a proteínas en el citoplasma o su devolución mediante transporte activo al espacio apoplástico u orgánulos (Kudla, J. y col., 2010). El transporte activo implica ATPasas presentes en la membrana plasmática (ATPasas tipo IIB) o en el retículo endoplásmico (ATPasas tipo IIA) (Chen, X.F. y col., 1997; Harper, J.F. y col., 1998). La recaptación al tonoplasto implica la actuación de antiportadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ de la familia CAX (*Ca*lcium *e*Xchanger) (Shigaki, T. y Hirschi, K.D., 2006). El canal vacuolar AtTCP1 parece estar implicado también en este proceso de reabsorción de Ca^{2+} (Pottosin, I. y col., 2009), no mediante su transporte directamente pero si a través del control de las señales de este catión (Ranf, S. y col., 2008).

La participación del Ca^{2+} como molécula de señalización en respuesta a la deficiencia de K^+ se había considerado por la implicación de sensores de Ca^{2+} en la regulación de canales y transportadores de K^+ . Sin embargo, no ha sido hasta hace poco cuando se ha demostrado, mediante la utilización de una proteína reportera de Ca^{2+} , YC3.6 (Costa, A. y Kudla, J., 2015), la inducción de dos señales de Ca^{2+} citoplasmático en respuesta a bajo K^+ (Behera, S. y col., 2017).

El incremento intracelular de Ca^{2+} es percibido por sensores de Ca^{2+} , como las calmodulinas (CaM) (Zielinski, R.E., 1998), las proteínas dependientes de Ca^{2+} (CDPK, '*Ca*lcium *D*ependent *P*rotein *K*inases') (Harmon, A.C. y col., 2000), las proteínas CBL ('*Ca*lcineurin *B*-*L*ike') (Kudla, J. y col., 1999) u otras proteínas de unión a Ca^{2+} (Reddy, A.S.N., 2001). Debido a su relevancia en esta Tesis Doctoral, las proteínas CBL se desarrollan detalladamente en el

Introducción

apartado 3.1.6.1, junto con las proteínas CIPKs (*Calcineurin B-like Interacting Protein Kinases*), con las que forman un complejo implicado en la respuesta a numerosos estreses.

La señalización por Ca^{2+} implica también a proteínas quinasa, fosfatasas y otras dianas que traducen la señal de Ca^{2+} 'aguas-abajo'.

3.1.4-Fitohormonas.

Varios estudios han mostrado la implicación de distintas fitohormonas en la señalización por bajo K^+ , resultando en efectos sobre la expresión de genes, en la disminución del crecimiento de la raíz primaria y de raíces laterales, y en el aumento del número y crecimiento de pelos radicales (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Armengaud, P. y col., 2004; Shin, R. y col., 2007; Kim, M.J. y col., 2012).

3.1.4.1-Etileno.

El etileno es una hormona en estado gaseoso, involucrada en numerosos procesos de la planta, incluyendo la germinación, senescencia y madurez de fruto (Abeles, F., Morgan Pw Y Saltveit Me, 1992). También juega un papel importante en la señalización de estreses bióticos y abióticos (Abeles, F., Morgan Pw Y Saltveit Me, 1992; Kazan, K., 2015; Shakeel, S.N. y col., 2013).

El etileno es sintetizado a partir de metionina a través de una ruta que requiere de las enzimas S-adenosil metionina sintetasa (SAMS), 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintetasa (ACS) y 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO) (Sauter, M. y col., 2013). En *Arabidopsis* se ha descrito un mecanismo de señalización en respuesta al etileno (Shakeel, S.N. y col., 2013), mecanismo que comprende la estabilización de la proteína EIN3, responsable de la activación de numerosos genes. EIN3 pertenece a una familia de factores de transcripción (FT), que incluye a las proteínas EIL (Wang, F.F. y col., 2013). Los FT del tipo ERF (del inglés, *Ethylene Response Factors*) actúan 'aguas-abajo' de EIN3, activando o reprimiendo genes implicados en la respuesta a etileno, aunque algunos ERF pueden ser activados por FT independientes al etileno (Wang, F.F. y col., 2013; Thirugnanasambantham, K. y col., 2015).

En raíces de *Arabidopsis*, se ha observado un aumento en la producción de etileno en condiciones de ayuno de K^+ (Jung, J.Y. y col., 2009), así como un incremento en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y señalización del etileno en respuesta al ayuno de K^+ y de un FT de tipo A2P/ERF (del inglés, 'APETALA2'/ 'Ethylene Response Factor'), denominado AtRAP2.11 ('Rhoptry-Associated Protein 2.11') (Kim, M.J. y col., 2012). AtRAP2.11 parece estar implicado en la sobreexpresión de *AtHAK5* en respuesta a etileno (Kim, M.J. y col., 2012) (Ver más adelante apartado 3.2.1.2).

3.1.4.2-Ácido jasmónico.

El ácido jasmónico (JA, del inglés '*Jasmonic Acid*'), es una fitohormona que participa en numerosos procesos fisiológicos de la planta, incluyendo inhibición del crecimiento, fertilidad, senescencia, y señalización en estreses bióticos y abióticos (Kramell, R. y col., 2000; Vigliocco, A. y col., 2002). Su biosíntesis tiene lugar tras la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados por la enzima lipooxigenasa, produciendo oxilipinas como compuestos intermediarios (Stintzi, A. y col., 2001; Howe, G.A. y Schilmiller, A.L., 2002). La forma activa del JA, jasmonil-iso-leucina (Jal-I), se une directamente a la proteína F-box, presente en su complejo receptor, CORONATINE INSENSITIVE (COI1), activándose la vía de señalización del JA (Chini, A. y col., 2007; Yan, J.B. y col., 2009; Sheard, L.B. y col., 2010).

Numerosos transcritos de proteínas involucradas en la biosíntesis de JA muestran cambios en su expresión en condiciones de ayuno de K^+ , resultando en un aumento de los niveles de JA durante ayuno del mismo (Armengaud, P. y col., 2004). Estos resultados muestran un posible papel de esta hormona en la señalización en respuesta a bajo K^+ . También se ha observado la regulación de varios canales de K^+ , que podrían participar en la redistribución de este catión entre los distintos compartimentos celulares, por JA (Evans, N.H., 2003) (Amtmann, A. y col., 2004).

3.1.4.3-Auxina.

La auxina, una hormona derivada del triptófano, está implicada en los procesos de crecimiento de cada tejido de la planta (Teale, W.D. y col., 2006). Durante el crecimiento

Introducción

primario, la auxina se sintetiza principalmente en el ápice de la parte aérea y se transporta hacia la raíz a través de los tejidos vasculares (Sabatini, S. y col., 1999; Friml, J. y col., 2002; Blilou, I. y col., 2005). Su distribución se establece de forma asimétrica alrededor de la zona meristemática, donde la auxina se mueve en una orientación basipétala hacia la zona de elongación a través de los tejidos periféricos, incluyendo las células corticales y de la epidermis. Los transportadores de entrada, AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX); los facilitadores de salida, PIN-FORMED (PIN); los transportadores de salida, P-GLYCOPROTEIN (MDR/PGP/ABCB); y el transportador de K^+ de la familia HAK, AtKUP4 (TRH1), constituyen los elementos principales del mecanismo mediante el cual la auxina regula la morfogénesis y crecimiento de la raíz (Kramer, E.M., 2004; Vicente-Agullo, F. y col., 2004; Blilou, I. y col., 2005; Vieten, A. y col., 2005; Wisniewska, J. y col., 2006).

Aunque la auxina puede estar involucrada en la expresión de canales de K^+ (Philipp, K. y col., 1999), no se han identificado los mecanismos implicados en las variaciones en la concentración de esta hormona en plantas de Arabidopsis sujetas a deficiencia de K^+ . Los cambios en la localización, concentración y sensibilidad de esta hormona pueden llevar a cabo la restricción del crecimiento de las raíces laterales tras un ayuno prolongado de K^+ .

Los factores de respuesta a auxina (ARFs, del inglés '*Auxin Response Factors*') son importantes FT implicados en la regulación de la expresión de genes de respuesta a auxina (Tiwari, S.B. y col., 2003; Guilfoyle, T.J. y Hagen, G., 2007), y pueden dividirse en ARF activadores o ARF represores, según la función que ejerzan sobre la expresión de los genes (Guilfoyle, T.J. y Hagen, G., 2007). Estos FT participan en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en la adaptación a estreses (Hardtke, C.S. y Berleth, T., 1998; Wang, L. y col., 2011; Yang, J. y col., 2013). El FT de tipo MYB, MYB77, se encuentra reprimido en condiciones de bajo K^+ , y mediante su interacción con ARF7, controla el desarrollo de raíces laterales en respuesta a las condiciones ambientales (Shin, R. y col., 2007). Entre los genes modulados por estos FT se encuentra AtHAK5, cuya expresión está reprimida por ARF2 en condiciones de K^+ suficiente (Zhao, S. y col., 2016) (ver más adelante, apartado 3.2.1).

3.1.4.4-Ácido abscísico.

El ácido abscísico (ABA) es una molécula de pequeño tamaño que participa en procesos de crecimiento y regulación de respuesta a estreses. Entre los eventos moleculares regulados por

esta hormona, destaca la respuesta a estrés por déficit de agua y crecimiento de la planta. En respuesta a un déficit de agua, el ABA induce la activación de canales de aniones, como SLAC1, que origina una despolarización de la membrana plasmática en las células oclusivas (Levchenko, V. y col., 2005; Vahisalu, T. y col., 2008). La despolarización de la membrana plasmática da lugar al descenso de la actividad de canales rectificadores de entrada de K^+ , como KAT1/KAT2, y la activación de canales de K^+ de rectificación de salida, como GORK, lo que origina el eflujo de K^+ de las células guarda. La salida de K^+ junto con la de aniones (Cl^- y NO_3^-) resultan en la pérdida de turgor celular y causa el cierre de estomas (Ache, P. y col., 2000; Kim, T.-H. y col., 2010; Schroeder, J.I. y Hagiwara, S., 1989).

Entre las proteínas que destacan en esta regulación por ABA también se encuentran la proteína quinasa SNF1-related 2 (SRK2E/OST1/SnRK2.6) y los transportadores de K^+ KUP6, KUP8 y KUP2, implicados en la homeostasis de K^+ (Osakabe, Y. y col., 2013).

El ABA regula varios procesos en respuesta a múltiples estreses, incluyendo la deficiencia de K^+ . En condiciones de bajo K^+ , se activa la biosíntesis de ABA y la señalización a través de la proteína nuclear NPX1 (NUCLEAR PROTEIN X1) (Kim, M.J. y col., 2009). El tratamiento con ABA induce a la peroxidasa *RCI3*, relacionada con la producción de ROS implicada en la señalización de bajo K^+ en la inducción de *AtHAK5* (Kim, M.J. y col., 2010) (ver apartado 3.1.2 y más adelante, el apartado 3.2.1)

3.1.4.5-Giberelinas.

Las giberelinas (GAs) son hormonas involucradas en varios procesos de la planta, como la división celular, la morfogénesis de raíz y parte aérea, así como en la respuesta adaptativa a limitaciones nutricionales. Las GAs se sintetizan a partir del *trans*-geranilgeranil difosfato (GGPP), mediante la acción de ciclasas, monooxigenasas y enzimas ODDs ('2-oxoglutarate dependent dioxygenase') (Toyomasu, T. y col., 1997; Hedden, P. y Proebsting, W.M., 1999; Garcia-Martinez, J.L., 1997). Las enzimas GAs 2-oxidasas catabolizan la reacción de inactivación de las GAs, con el objetivo de mantener las concentraciones de GAs biológicamente activas en los tejidos (Thomas, S.G. y col., 1999).

La señalización en respuesta a GAs incluye la degradación de las proteínas DELLA mediante ubiquitinación (Jiang, C. y Fu, X., 2007). Las proteínas DELLAs pertenecen a un subgrupo de la familia GRAS de FT, y actúan como represores de la señalización por GAs,

Introducción

contribuyendo a modular el crecimiento y desarrollo de las plantas (Hauvermale, A.L. y col., 2012; Harberd, N.P. y col., 2009).

Mutantes de las proteínas DELLA mostraron distintos patrones de expresión de *AtHAK5* (Oliferuk, S. y col., 2017), por lo que las GAs y las proteínas DELLA podrían estar involucradas en la señalización en respuesta a bajo K^+ (ver más adelante, el apartado 3.2.1).

3.1.5- Proteínas MAPKs.

Las proteínas MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), constituyen una familia de quinasas de serina/treonina conservadas en todos los organismos eucariotas, que están involucradas en la señalización intracelular en respuesta a señales ambientales y del desarrollo.

Se caracterizan por llevar a cabo un funcionamiento en estructuras modulares conformadas por al menos tres quinasas: MAPKKK, MAPKK, MAPK. La interacción y formación de un complejo del módulo trimérico de MAPKs requiere de la fosforilación secuencial de cada elemento de la misma, por el anterior. La MAPK final, es la encargada de fosforilar al sustrato final de la cascada. El acoplamiento y actividad pueden estar regulados por elementos externos a la cascada, como proteínas de andamiaje (*scaffolding*). Existe una familia de fosfatasas de MAPKs involucradas directamente en la defosforilación e inactivación de los complejos MAPK, además de otras familias de fosfatasas de la familia PP2C, capaces de interactuar con las proteínas MAPK (Colcombet, J. y Hirt, H., 2008).

El estudio de las cascadas de MAPKs ha revelado la diversa funcionalidad de estas proteínas a lo largo de todo el metabolismo celular, siendo capaces de activar, desactivar y modular respuestas de topo tipo, ante diversos estímulos ambientales y del desarrollo.

Existen múltiples cascadas de MAPK quinasas que responden a ROS, Ca^{2+} , y fitohormonas (Lee, K. y col., 2008; Burnett, E.C. y col., 2000; Xing, Y. y col., 2007; Ren, D.T. y col., 2002), y estas moléculas pueden participar en más de una ruta de señalización, lo que añade complejidad al proceso de coordinación en respuesta a estrés (Smekalova, V. y col., 2014).

Los mecanismos de regulación mejor descritos en plantas dentro de la ruta de las MAPK son los de respuesta a estrés biótico. En respuesta a estrés abiótico, la ruta de señalización

más conocida fue descrita en plantas de *Arabidopsis* sometidas a tratamientos de bajas temperaturas y sal (Teige, M. y col., 2004).

En respuesta a deficiencia de K^+ no hay descrita ninguna ruta de señalización que implique proteínas MAPKs, aunque en un estudio de expresión génica mediante micromatrices en *Arabidopsis* se observaron cambios en los patrones de transcripción de MAPKs en respuesta a ayuno de K^+ y suplementación externa de K^+ (Armengaud, P. y col., 2004). En raíces de plantas de tomate expuestas a ayuno de K^+ , se observó una rápida y fuerte inducción de una MAPK homóloga a la proteína WIPK (del inglés, '*Wound Inducible Protein Kinase*') de *Nicotiana tabacum*; y también de la MAPKK, MEK1 (Wang, Y.-H. y col., 2002).

3.1.6- Proteínas SnRKs.

La familia SnRK (*Snf1-related protein kinases*) está constituida por las proteínas vegetales emparentadas filogenéticamente con las proteínas SNF1 (*'Sucrose-Non fermenting 1'*) de levadura y AMPK (*'AMP-activated Protein Kinases'*) de animales, encargadas de la regulación y señalización de procesos metabólicos y de respuesta al estrés. Las SnRK vegetales presentan similitudes estructurales y funcionales con las correspondientes proteínas de levadura y de animales, pero también multitud de diferencias en su regulación, funcionamiento y diversidad.

Esta familia se divide a su vez en tres subfamilias, SnRK1, SnRK2 y SnRK3. Las proteínas de la subfamilia SnRK1 son las más similares a SNF1 y también presentan funciones en la señalización de la utilización de la energía de la planta (Baena-Gonzalez, E. y col., 2007), mientras que las subfamilias SnRK2 y SnRK3 son específicas de plantas y forman parte de las rutas de señalización en respuesta a estreses abióticos (Luan, S., 2009; Hrabak, E.M. y col., 2003).

Las proteínas SnRK poseen dos dominios bien diferenciados en todos los miembros de la familia, un dominio N-terminal quinasa catalítico y un dominio C-terminal regulador. Mientras el dominio N-terminal está conservado (42-45 % identidad) entre las distintas proteínas (Halford, N.G. y Hey, S.J., 2009), el C-terminal presenta marcadas diferencias, lo que permite que la regulación de la actividad que tiene lugar en este dominio sea muy variable entre las subfamilias y, por tanto, genera diferentes rutas regulatorias para cada proteína. La regulación sobre el dominio N-terminal es común a todos los miembros y supone el mecanismo de

Introducción

activación/inactivación de la actividad de la proteína (Chaves-Sanjuan, A. y col., 2014; Halford, N.G. y Hey, S.J., 2009).

3.1.6.1- Complejos CIPK/CBL.

El estudio de la función y regulación de las proteínas de la subfamilia SnRK3 se ha desarrollado históricamente de manera conjunta con las proteínas de la familia CBL ('*Calcineurin B-like protein*'), con las que interactúan, motivo por el que a las proteínas SnRK3 se les conoce comúnmente como CIPKs (del inglés, '*Calcineurin B-like Interacting Protein Kinases*').

Los sensores de Ca^{2+} constituyen un papel importante en la señalización por Ca^{2+} . Cuando estas proteínas unen Ca^{2+} , sufren un cambio conformacional que les permite interactuar y activar a sus proteínas diana (Das, R. y Pandey, G.K., 2010). Las proteínas CBL poseen un dominio de unión a Ca^{2+} consistente en 4 dominios 'EF-hand'; y un dominio denominado PFPF, cuyo residuo de serina conservado es fosforilado por las CIPKs (Hashimoto, K. y col., 2012; Du, W.M. y col., 2011). Algunas CBLs poseen también un motivo MGCXXS/T, que puede contener modificaciones lipídicas para poder asociarse a las membranas (Batistic, O. y col., 2008; Batistic, O. y Kudla, J., 2012) (Figura 7A).

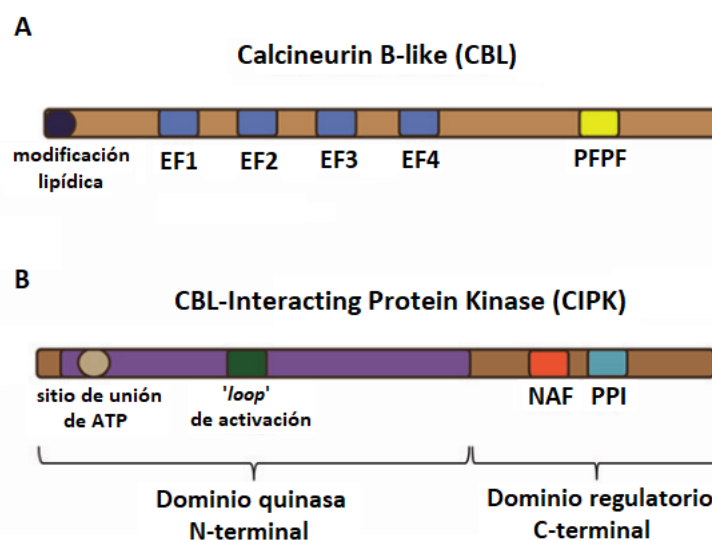


Figura 7. Dominios y motivos presentes en las proteínas CBLs y CIPKs. Las proteínas CBLs (A) contienen un motivo que puede albergar modificaciones lipídicas (círculo azul oscuro), motivos 'EF-hand' de unión

al Ca^{2+} (rectángulos azules), y el motivo PFPF (rectángulo amarillo) implicado en la fosforilación por las CIPKs. Las proteínas CIPKs (B), presentan un dominio N-terminal quinasa donde se encuentra el sitio de unión a ATP (círculo marrón) y el de activación (rectángulo verde); y un dominio C-terminal regulatorio que contiene los motivos NAF (rectángulo rojo) de unión a CBLs, y PPI (rectángulo azul claro) de unión a fosfatasa. Figura modificada de (Pandey, G. y col., 2014).

El dominio N-terminal catalítico de las proteínas CIPK contiene un motivo quinasa serina/treonina, en donde se sitúa el sitio de unión a ATP. El dominio C-terminal tiene 21 aminoácidos conservados que constituyen un dominio de auto-inhibición denominado NAF (también conocido como FISL), a través del cual se une la proteína CBL para su activación (Albrecht, V. y col., 2001). El motivo PPI es responsable de la interacción con fosfatasa, implicadas en la regulación negativa de su actividad (Ohta, M. y col., 2003) (Figura 7B).

El lazo ('loop') de activación (Hanks, S.K. y Hunter, T., 1995) es una región reguladora de la actividad que contiene entre 1 y 3 residuos que pueden ser fosforilados (serina/treonina/tirosina), fundamentales para la activación de la quinasa (Shen, M.Q. y Yen, A., 2009). La fosforilación provoca un cambio conformacional, imprescindible para la reacción de catálisis, en la posición relativa de los residuos que conforman el sitio de reconocimiento del ATP y del péptido sustrato (Adams, J.A., 2003; Nolen, B. y col., 2004).

Adicionalmente al mecanismo de activación de las CIPKs, las CBLs están implicadas en su reclutamiento al sitio de acción mediante modificaciones en su dominio N-terminal (Sanchez-Barrena, M.J. y col., 2007; Sanchez-Barrena, M.J. y col., 2013).

En el mecanismo de señalización en respuesta a Ca^{2+} , la proteína CBL actúa como sensor y las proteínas CIPKs como efectores para llevar a cabo la transducción de la señal. Entre las dianas de las CIPKs se encuentran distintos tipos de proteínas como fosfatasa, transportadores y canales, FTs y enzimas (Figura 8), lo que conlleva a la participación de este complejo en la regulación de multitud de procesos biológicos en las plantas (Weinl, S. y Kudla, 2009; Batistic, O. y Kudla, J., 2009).

Introducción

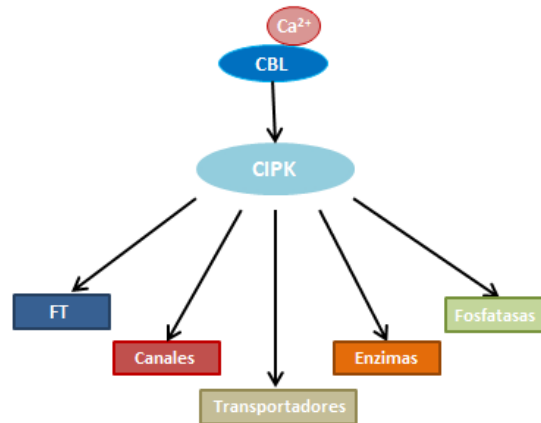


Figura 8. Dianas de interacción de las proteínas CIPK. Entre las proteínas que interaccionan con las CIPKs, destacan los factores de transcripción (FT), canales y transportadores, enzimas y fosfatasas. Figura modificada de (Pandey, G. y col., 2014).

El papel del complejo CIPK/CBL en la respuesta a la deficiencia de K^+ a través de su interacción con transportadores y canales de K^+ se detalla en el apartado 3.2.2.

3.2- MECANISMOS DE REGULACIÓN EN RESPUESTA A LA DEFICIENCIA DE K^+ .

3.2.1- Regulación transcripcional/postranscripcional.

La regulación de la transcripción de genes constituye una herramienta de regulación de las plantas en respuesta a los estímulos ambientales. Se han llevado a cabo análisis transcriptómicos de plantas sometidas a deficiencias nutricionales que revelan perfiles de expresión de los genes, lo que permite estudiar cómo se regulan en respuesta a dichas deficiencias. A continuación, se detallan genes que muestran regulación a nivel transcripcional en condiciones de deficiencia de K^+ .

3.2.1.1- Canales y transportadores de K^+ .

Muchos transcritos que codifican transportadores de iones se inducen cuando la concentración de su sustrato disminuye en el medio, y dicha inducción tiene como objetivo mejorar la absorción del nutriente desde el medio externo (Ammann, A. y Blatt, M.R., 2009).

En Arabidopsis, los transcritos que codifican para los transportadores de K^+ , AtHAK5, AtKEA5, AtKUP3, AtCHX13 y AtCHX17, se inducen en condiciones de bajo K^+ (Ahn, S.J. y col., 2004; Cellier, F. y col., 2004; Gierth, M. y Maser, P., 2007; Kim, E.J. y col., 1998; Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Zhao, J. y col., 2008). Entre estos genes, destaca la fuerte inducción de AtHAK5. Los transcritos de transportadores homólogos a AtHAK5 de otras especies como *SIHAK5* (Wang, Y.H. y col., 2002), *HvHAK1* (Santa-María, G.E. y col., 1997), *CaHAK1* (Martínez-Cordero, M.A. y col., 2005), *OsHAK5* (Yang, T. y col., 2014) y *ThHAK5* (Alemán, F. y col., 2009a) también se inducen a bajas concentraciones de K^+ externo.

Sin embargo, también hay transportadores de K^+ de la familia HAK/KUP/KT que no muestran regulación transcripcional en respuesta a deficiencia de K^+ (Ahn, S.J. y col., 2004). Por ejemplo, el transportador KUP7 no se induce por bajo K^+ ni las líneas sobreexpresoras de KUP7 muestran mejora en la tolerancia a bajo K^+ (Han, M. y col., 2016).

Aunque la mayoría de canales de K^+ no muestran regulación transcripcional en condiciones de bajo K^+ , el canal tipo *shaker* de trigo (*Triticum aestivum*), *TaAKT1*, se induce en condiciones de deficiencia de K^+ (Buschmann, P.H. y col., 2000). *AKT1* de Arabidopsis, sin embargo, no se induce por bajo K^+ (Lagarde, D. y col., 1996; Pilot, G. y col., 2003b), aunque la expresión de *AtCIPK23*, que codifica para una proteína que regula positivamente al canal AKT1 (Cheong, Y.H. y col., 2007; Xu, J. y col., 2006) y de *AtKC1*, regulador también de AKT1, muestran regulación transcripcional en función del K^+ externo (Geiger, D. y col., 2009; Wang, Y. y col., 2010) (ver más adelante, el apartado 3.2.2).

3.2.1.2- Factores de transcripción.

Los FTs son proteínas que se unen a secuencias específicas del ADN, en regiones promotoras adyacentes a los genes, de forma que controlan la transcripción de los mismos, ya sea activando o reprimiendo. Las secuencias de ADN a la que se une el FT se conocen como 'sitio de unión del factor de transcripción' o 'elemento de respuesta'.

Según su función, los FTs pueden clasificarse en: generales o basales, que son los requeridos, junto con la ARN polimerasa II, para que se inicie la transcripción (proteínas de unión a la caja TATA); y específicos o regulatorios, que ejercen funciones específicas sobre genes o tejidos y modulan la transcripción de sus genes diana en función de diferentes

Introducción

estímulos. Según la estructura del dominio de unión al ADN que presente el FT, se agrupan en diferentes familias, que a su vez pueden dividirse en subfamilias.

Los FT están implicados en funciones fundamentales en casi todos los procesos biológicos, como el desarrollo, crecimiento, respuesta a factores ambientales, etc.

Como se ha mencionado anteriormente, entre los genes que codifican sistemas de transporte de K^+ , el gen *AtHAK5* es el que presenta una mayor respuesta a la presencia de K^+ . En los últimos años, se han identificado numerosos FT relacionados con fitohormonas que se unen al promotor del gen *AtHAK5*, a través de los elementos de respuesta específicos presentes en él, regulando su transcripción.

El FT de tipo AP2/ERF *RAP2.11* se induce en condiciones de bajo K^+ de forma dependiente a la producción de ROS y etileno, y se une a los motivos ERE y GCC-box del promotor de *AtHAK5*, induciendo su expresión (Kim, M.J. y col., 2012). Además, *RAP2.11* estaría implicado en la regulación de otros genes relacionados con la respuesta a bajo K^+ , como genes implicados en la producción de ROS y de respuesta a etileno y auxina, contribuyendo así a una respuesta coordinada en la cascada de señalización en respuesta a la deficiencia de K^+ .

El FT de respuesta a auxina, *ARF2*, se une directamente al motivo AuxREs presente también en el promotor de *AtHAK5*, reprimiendo su expresión en condiciones de K^+ suficiente. Cuando hay deficiencia de K^+ , *ARF2* es fosforilado, lo que impide su unión a *AtHAK5*, y por tanto, no lleva a cabo la represión de su transcripción (Zhao, S. y col., 2016).

La inducción de *AtHAK5* en respuesta a bajo K^+ se ve disminuida en el mutante *gai-1*, lo que muestra la posible participación de las proteínas DELLA en este proceso de señalización (Oliferuk, S. y col., 2017). El mecanismo por el cual estarían implicadas en la expresión de *AtHAK5* es desconocido, pero podría estar relacionado con la interacción de GAI con FTs que modulan *AtHAK5*. Por ejemplo, la proteína ALCATRAZ (ALC), FT que parece interactuar con las proteínas DELLA (Arnaud, N. y col., 2010), estaría implicado en el control de la expresión de *AtHAK5* (Hong, J.P. y col., 2013).

Hong, J.P. y col., (2013) llevaron a cabo un estudio donde identificaron alrededor de 30 FTs implicados en la regulación de *AtHAK5* en respuesta a bajo K^+ externo. De éstos, cuatro de ellos fueron caracterizados. Estos FTs, *DDF2* (*Dwarf and Delayed Flowering 2*) *JLO* (*Jagged Lateral Organs*), *TFII_2* (*Transcription initiation Factor II_A*) y *bHLH121* (*basic Helix-Loop-Helix 121*), se inducen en respuesta a ayuno de K^+ y se unen directamente al promotor de *AtHAK5*, activando su expresión (Hong, J.P. y col., 2013).

3.2.1.3- Otros genes implicados en la respuesta a bajo K⁺.

Los genes *RHD2* (codifica a una NADPH oxidasa) y *RCI3* (codifica una peroxidasa) de *Arabidopsis*, se inducen en condiciones de ayuno de K⁺. Además, la inducción de estos genes sería necesaria para la regulación transcripcional de genes dependientes de ROS que también participan en la respuesta a bajas concentraciones de K⁺ (Kim, M.J. y col., 2010; Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004). En el mutante deficiente *rh2*, se pierde la sobreexpresión de la enzima ACO y de un FT en respuesta al etileno en condiciones de bajo K⁺, lo que demuestra que la señalización por ROS se sitúa 'aguas-arriba' de la señal de etileno en la respuesta a la deficiencia de K⁺ (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004).

Tanto en *Arabidopsis* como en arroz, distintos sensores de Ca²⁺, como calmodulinas (CaM) y calmodulinas-*like*, también presentaron cambios en la expresión de sus transcritos en respuesta a bajo K⁺ (Armengaud, P. y col., 2004; Ma, T.-L. y col., 2012).

También se ha descrito que genes involucrados en la biosíntesis del JA se encuentran inducidos de forma significativa en raíces de *Arabidopsis* ayunadas de K⁺ (Armengaud, P. y col., 2004).

3.2.2- Regulación postraducciona.

La regulación postraducciona constituye un mecanismo importante de regulación de proteínas, siendo la fosforilación de proteínas la modificación postraducciona más común en la transducción de señales (Kleist y Luan, 2016).

3.2.2.1- Regulación mediante fosforilación/defosforilación.

Numerosos estudios evidencian el mecanismo de fosforilación (Xu, J. y col., 2006; Quintero, F.J. y col., 2002; Li, L. y col., 2006) y defosforilación (Cherel, I. y col., 2002; Lee, S.C. y col., 2007) como un sistema de regulación de transportadores y canales de K⁺ en distintas especies de plantas.

Introducción

En *Arabidopsis*, el canal AKT1 es activado mediante fosforilación por el complejo AtCIPK23/AtCBL1 o AtCBL9 (Xu, J. y col., 2006; Li, L. y col., 2006) e inactivado por una fosfatasa del tipo PP2C, denominada AIP1 ('*AKT1-Interacting PP2C 1*') (Lee, S.C. y col., 2007). En arroz y vid (*Vitis vinifera*), el complejo CIPK23/CBL1 también estaría participando en la activación de los canales OsAKT1 (Li, J. y col., 2014) y VvK1.1 (Cuellar, T. y col., 2010).

3.2.2.2- Otros mecanismos de regulación postraduccional.

Los estudios en animales han demostrado que las subunidades de canales de K^+ de la misma subfamilia, pueden unirse y formar estructuras heterotetraméricas, dando lugar a un canal con nuevas propiedades, aparentemente distintas a las de los canales homotetraméricos (Ottshytsch, N. y col., 2002). Los canales de K^+ en plantas presentan similitud estructural a los canales de animales, indicando que la heterotetramerización puede ocurrir también entre ellos.

Las subunidades α de canales de K^+ de plantas de diferentes tejidos, especies y subfamilias pueden ensamblarse indiscriminadamente y formar canales de K^+ heterotetraméricos con diversas características (Dreyer, I. y col., 1997; Xicluna, J.R.M. y col., 2007). El canal heterotetramérico mejor estudiado en *Arabidopsis* es el complejo AKT1-AtKC1. AtKC1 no forma un canal homotetramérico funcional (Reintanz, B. y col., 2002) pero actúa como una subunidad α que modula negativamente a numerosos canales rectificadores de entrada de K^+ , como AKT1, AKT2, KAT1 y KAT2 (Duby, G. y col., 2008; Geiger, D. y col., 2009; Jeanguenin, L. y col., 2011; Wang, Y. y col., 2010). AtKC1 interacciona con AKT1 e inhibe las corrientes de K^+ mediadas por AKT1 debido a que modifica negativamente la dependencia de voltaje de AKT1 (Duby, G. y col., 2008; Geiger, D. y col., 2009; Wang, Y. y col., 2010). Esta regulación negativa evitaría la pérdida de K^+ a través de AKT1 en condiciones de deficiencia de K^+ (Geiger, D. y col., 2009; Wang, Y. y col., 2010).

Otras proteínas podrían estar implicadas en la regulación de los transportadores y canales de K^+ a través de su transporte por el citoplasma ('*trafficking*') (Honsbein, A. y col., 2009; Sutter, J.U. y col., 2006; Blatt, M. y col., 2006), estabilización en las membranas (Brauer, E.K. y col., 2016), degradación, etc.

SYP121 es una proteína de tipo SNARE ('*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein REceptor*'), que media el transporte y anclaje de canales de K^+ a la

membrana plasmática (Sutter, J.U. y col., 2006). En las raíces de *Arabidopsis*, SYP121 estaría interactuando con el canal AtKC1, promoviendo la apertura del canal AKT1 para que se produzca la absorción de K^+ (Honsbein, A. y col., 2009). Otra proteína SNARE, VAMP721, participa en la regulación de la actividad de AtKAT1 y AtKC1 (Zhang, B. y col., 2015).

ILK1 (*Integrin-Linked Kinase 1*) codifica a una Raf-like MAPKK quinasa (Chinchilla, D. y col., 2003) que contribuye a la defensa de la planta frente a bacterias patógenas y parece estar implicada en la acumulación y estabilidad del transportador de K^+ AtHAK5 en la membrana plasmática (Brauer, E.K. y col., 2016).

En la Figura 9 se muestran los mecanismos de señalización y regulación en respuesta a la deficiencia de K^+ descritos en raíces de *Arabidopsis*, de relevancia en la realización de esta Tesis Doctoral.

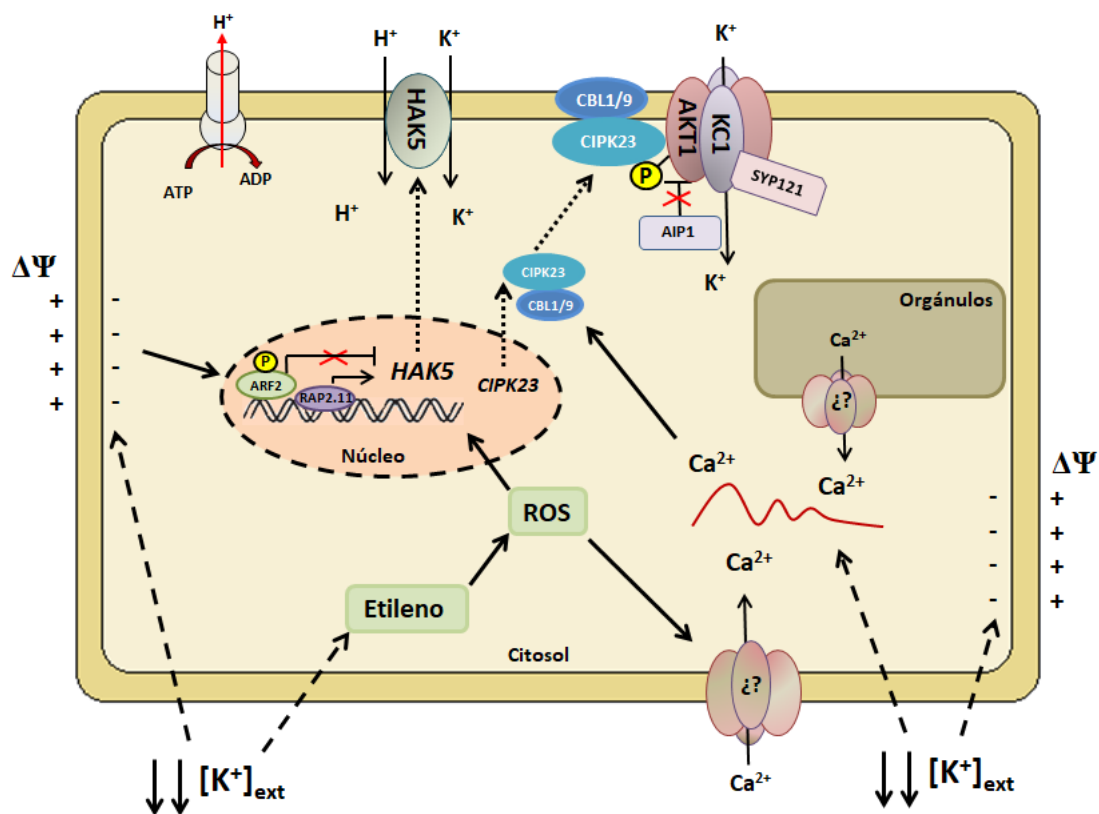


Figura 9. Mecanismos implicados en la señalización y regulación en respuesta a la deficiencia de K^+ externo en raíces de *Arabidopsis*. Un descenso en las concentraciones externas de K^+ ($[K^+]_{ext}$) origina una hiperpolarización de la membrana plasmática en las células de la epidermis y córtex de la raíz, lo que podría constituir el primer paso en la señalización por bajo K^+ . La percepción de deficiencia de K^+ produce un aumento en el contenido de etileno y de ROS, lo que lleva a la inducción del gen *AtHAK5*. En la inducción de *AtHAK5* en respuesta a bajo K^+ también estarían implicados factores de transcripción como RAP2.11, y ARF2. La señal de Ca^{2+} detectada en condiciones de bajo K^+ externo podría proceder

Introducción

del influjo desde orgánulos reservorios o del exterior, a través de canales de Ca^{2+} no identificados. AKT1 es activado a través de la fosforilación por el complejo CIPK/CBL, y por la subunidad de AtKC1 y la proteína SYP121. En condiciones de bajo K^+ , la función inactivadora de AIP1 se encuentra inhibida. La letra 'P' representa fosforilación; y la 'X' en rojo, inhibición de la función.

4- EL K^+ Y OTROS NUTRIENTES.

Numerosos estudios indican que las vías de señalización de la respuesta a la disponibilidad de los distintos nutrientes en las plantas están interconectadas (Hammond, J.P. y White, P.J., 2008; Amtmann, A. y Blatt, M.R., 2009; Wang, Y. y Wu, W.-H., 2013). La interacción entre los nutrientes en su proceso de absorción y el desequilibrio causado por la deficiencia de un nutriente determinado, se han estudiado previamente (Marschner, P., 2012). Por ejemplo, en algunas especies de plantas, la disminución del sulfato (SO_4^{2-}) externo origina cambios en el metabolismo del nitrógeno (N), dando lugar a un aumento de las concentraciones de este último en la parte aérea (Prosser, I.M. y col., 2001).

A nivel molecular también hay evidencias de las relaciones existentes entre los mecanismos implicados en la respuesta a la deficiencia de nutrientes. Estas conexiones han sido estudiadas a diferentes niveles (Wang, Y.-H. y col., 2002; Schachtman, D.P. y Shin, R., 2007; Shin, R., 2011; Tsay, Y.-F. y col., 2011) y se considera que podría existir una respuesta general a la deficiencia de nutrientes.

En condiciones de bajo K^+ , de nitrógeno (NO_3^-), de fósforo (PO_4^{3-}) y de azufre (SO_4^{2-}), aumenta la producción de ROS en la raíz (Schachtman, D.P. y Shin, R., 2007; Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Shin, R. y col., 2005) y también las concentraciones de etileno (García, M.J. y col., 2015). También es común la participación de ABA y JA en la señalización de la respuesta a la deficiencia de los distintos nutrientes (Forieri, I. y col., 2017).

La comparación de estudios proteómicos de plantas sometidas a deficiencia de K^+ , de NO_3^- y de PO_4^{3-} , revelaron grupos de proteínas comunes, implicadas en la señalización en estas deficiencias en raíces de tomate, como factores de transcripción, proteínas MAPKs, etc. (Wang, Y.-H. y col., 2002).

En cuanto a la absorción y transporte de nutrientes, se ha demostrado que hay transportadores de NO_3^- cuya expresión se reprime en plantas sometidas a ayuno de K^+

(Armengaud, P. y col., 2004); y en raíces de tomate, la transcripción de varios transportadores de nutrientes se induce por falta de K^+ y PO_4^{3-} (Wang, Y.-H. y col., 2002). En condiciones de ayuno de PO_4^{3-} , también se ha observado una inducción de transportadores de SO_4^{2-} (Misson, J. y col., 2005).

A nivel de regulación de los canales y transportadores, también hay mecanismos compartidos. El complejo AtCIPK23/AtCBL1 y AtCBL9 estaría regulando la activación del canal AKT1 de K^+ (Xu, J. y col., 2006; Li, L. y col., 2006) y también la absorción de NO_3^- a través del transportador AtNRT1.1 (CHL1) (Ho, C.H. y col., 2009).

AtCIPK23 estaría regulando la absorción de NH_4^+ a través de la inhibición transportador AtAMT1;1/1;2., impidiendo la acumulación citoplasmática de iones NH_4^+ en condiciones de altas concentraciones externas del mismo (Straub, T. y col., 2017).

Por tanto, parece evidente la existencia de interconexiones entre los mecanismos de señalización de la respuesta a la deficiencia de distintos nutrientes, así como la coordinación y regulación de su absorción y transporte.

5- PLANTAS MODELO Y DE INTERÉS AGRONÓMICO.

5.1- ARABIDOPSIS (*Arabidopsis thaliana* L.), PLANTA MODELO.

Los organismos modelo son especies en cuyo estudio experimental convergen un amplio número de equipos de investigación, con el fin de obtener conclusiones que puedan ser generalizables a otras especies. Reúnen características que facilitan su mantenimiento y manipulación, y que permiten la obtención de resultados en un periodo de tiempo razonablemente breve (Bolker, J.A., 1995).

Arabidopsis thaliana es una planta autógama perteneciente a la familia de las Brassicáceas o Crucíferas, familia muy amplia en la que se encuentran aproximadamente 340 géneros y más de 3.300 especies (Alshehbaz, I.A., 1984), y que se localiza, mayoritariamente, en regiones de clima moderado (Meyerowitz, E.M., 1987). Las estirpes aisladas en localizaciones concretas recibieron la denominación de “ecotipo”, y más tarde se le concedió el término “acceso” (*‘accession’*), definido como ‘un genotipo particular de una especie concreta, recolectado en

Introducción

una localización geográfica específica' (Alonso-Blanco, C. y Koornneef, M., 2000). No obstante, ambos términos coexisten en el uso corriente de la comunidad científica.

En el estudio de la biología molecular de plantas, el uso de *Arabidopsis* como sistema modelo frente al uso de bacterias y levaduras, permite el abordaje de estudios de respuesta integrada frente a un estrés, por ser un organismo pluricelular (Zhu, J.K., 2000).

A pesar de no tener interés agronómico, la utilización de *Arabidopsis* como modelo se ha impuesto sobre otras especies de plantas debido a la multitud de ventajas que presenta, que la hacen muy apropiada como organismo modelo en biología vegetal: capacidad de crecimiento en condiciones controladas, tamaño pequeño (30-40 cm), ciclo de vida corto (alrededor de 6 semanas) y elevada producción de semillas (> 1000/planta), con la posibilidad de almacenarse durante varios años con escasa pérdida de viabilidad (Page, D.R. y Grossniklaus, U., 2002). Pequeño genoma (125 Mb, megabases), un bajo porcentaje de secuencias repetitivas de ADN (10-15%), facilidad para obtener mutantes, disponibilidad de técnicas de mapeo estandarizadas y un eficiente sistema de transformación (Meyerowitz, E.M., 1987). Además, *Arabidopsis* es la primera planta superior cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2006). Hay disponibles, distintas colecciones de mutantes de inserción en los centros NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*), ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*) y SENDAI (*Arabidopsis Seed Stock Center*).

Además, cuenta con una gran cantidad de herramientas genéticas: líneas recombinantes endógamas, marcadores fenotípicos, marcadores modulares polimórficos, bancos de clones de ADNc, etc; y bioinformáticas: servidores disponibles como TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) (Huala, E. y col., 2001), donde se llevan a cabo actualizaciones periódicas sobre los estudios de *Arabidopsis*.

5.2- TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.), PLANTA DE INTERÉS AGRONÓMICO.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza de enorme importancia económica debido a las grandes superficies que se destinan a su cultivo en todo el mundo, siendo la segunda hortaliza, después de la patata, con mayor importancia económica a nivel mundial, y su producción va en incremento a medida que aumenta la población (Bergougnoux, V., 2014).

El interés del tomate en investigación ha ido creciendo a lo largo de los años por el descubrimiento de los efectos beneficiosos que parece tener sobre nuestro organismo, siendo cada vez más los estudios que confirman que este vegetal es una fuente de compuestos con propiedades preventivas y curativas. Aporta beneficios en la prevención de ciertos cánceres debido a su perfil nutricional, basado en una combinación equilibrada de antioxidantes (vitamina C, carotenoides y flavonoides), minerales, un contenido alto en ácido fólico y un nivel bajo en grasas, y por sus propiedades antienvjecimiento debido a la presencia de licopeno. Está muy presente en la dieta diaria, ya que las variedades selectas están disponibles durante todo el año y representa un producto versátil para multitud de propuestas culinarias.

El tomate pertenece al género *Solanum* de la familia *Solanaceae*, la cual engloba aproximadamente 90 géneros y más de 3.000 especies.

Además de la importancia económica del tomate, esta especie se ha convertido en un modelo excelente de investigación. Su genoma es relativamente pequeño (950 Mb) y existen numerosas fuentes genéticas disponibles: poblaciones cartografiadas, marcadores de ADN (Tanksley, S.D. y col., 1992), `microarrays´ y bases de datos públicas (Yano, K. y col., 2007), etc. Su genoma se secuenció en 2012 (*Tomato Genome Consortium*, 2012) a través del consorcio internacional *Solanaceae Genome Project* (SOL), que involucró a 14 países y se desarrolló durante 8 años.

5.2.1- El cultivar Micro-Tom.

El cultivar Micro-Tom de tomate se desarrolló con finalidad ornamental, a partir del cruce entre los cultivares Florida, Basket y Ohio 4013, exhibiendo un fenotipo enano con frutos maduros y rojos (Harbaugh y Scott, 1999). El fenotipo enano es debido a varias mutaciones puntuales en los genes *Dwarf (D)*, *Self-Pruning (SP)* e *Interno de Lenght reduction (Ilr)* (Marti, E. y col., 2006) y presenta un crecimiento determinado y un ciclo de vida corto.

Su pequeño tamaño, su rápido crecimiento y su fácil transformación le proponen como el cultivar más adecuado frente a otros, para la investigación en tomate.

II. Objetivos

El K^+ constituye uno de los elementos minerales más importantes de las plantas, y es el catión más abundante respecto al peso seco, por lo que la nutrición de K^+ es un factor clave para el crecimiento y el cultivo de cualquier tipo de planta.

La adaptación de las plantas a distintas situaciones de suministro de K^+ depende no sólo de la disponibilidad de K^+ sino también de otras condiciones ambientales como la disponibilidad de otros nutrientes o la presencia de iones que pueden ser tóxicos, como el Na^+ y el Cs^+ .

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral ha consistido en profundizar en el conocimiento de los sistemas de absorción de K^+ en las plantas, tanto en su función como en su regulación, mediante el estudio de los procesos fisiológicos y mecanismos moleculares implicados en la homeostasis de K^+ , en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* y en la especie de interés agronómico *Solanum lycopersicum*.

En este contexto, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- 1- Estudio del efecto de la presencia de otros nutrientes distintos al K^+ sobre la adquisición y homeostasis del mismo, en plantas de *Arabidopsis* y tomate.
 - 1.1- Efecto de la deficiencia de NO_3^- , PO_4^{3-} o SO_4^{2-} sobre la absorción de K^+ a través de los sistemas *AKT1* y *AtHAK5* en *Arabidopsis* y *LKT1* y *SIHAK5* en tomate.
 - 1.2- Efecto de la deficiencia de NO_3^- , PO_4^{3-} o SO_4^{2-} sobre la translocación de K^+ de la raíz a la parte aérea.
- 2- Estudio de los mecanismos implicados en la regulación transcripcional/postranscripcional del transportador de alta afinidad *AtHAK5* de *Arabidopsis* y *SIHAK5* de tomate, en respuesta a la deficiencia de K^+ .
 - 2.1- Caracterización de la vía de señalización por deficiencia de K^+ implicada en la regulación transcripcional del gen *SIHAK5*, en plantas de tomate.
 - Efecto de la presencia de Ca^{2+} y Na^+ sobre la inducción del gen *SIHAK5* y sobre la absorción de K^+ de alta afinidad.
 - Papel del etileno y de las ROS en la regulación del gen *SIHAK5*.
 - 2.2- Identificación y caracterización molecular de mecanismos de regulación postranscripcional del transportador *AtHAK5* de *Arabidopsis*.
- 3- Estudio de la absorción de K^+ y Cs^+ en las plantas de tomate.
 - 3.1- Influencia de la presencia de Cs^+ sobre la absorción de K^+ de alta afinidad.

Objetivos

- 3.2- Identificación de sistemas implicados en la absorción de Cs^+ .

- 4- Estudio transcriptómico de plantas de tomate sometidas a ayuno de K^+ mediante RNA-Seq.
 - 4.1- Identificación de transcritos expresados diferencialmente en raíz, parte aérea y fruto en respuesta a deficiencia de K^+ .

III. Materiales y Métodos

1- MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1- BACTERIAS.

1.1.1- CEPAS UTILIZADAS.

1.1.1.1- *Escherichia coli*.

Las propagaciones de ADN plasmídico se realizaron con las cepas de *E. coli* recogidas en la Tabla 1. Las cepas DH5 α y Top10 se utilizaron indistintamente según disponibilidad del laboratorio, para procedimientos de propagación de ADN plasmídico. La cepa GM119 se utilizó cuando se necesitaba ADN plasmídico sin metilación dam para su digestión con enzimas de restricción sensibles a esta metilación.

Tabla 1. Cepas utilizadas de *E. coli*.

Cepa	Genotipo	Referencia
DH5 α	$\Delta(argF-lac)169$, $\phi80dlacZ58(M15)$, $\Delta phoA8$, $glnX44(AS)$, λ^- , $deoR481$, $rfbC1$, $gyrA96(NalR)$, $recA1$, $endA1$, $thiE1$, $hsdR17$	(Hanahan, D., 1985)
Top10	$\Delta(araA-leu)7697$, $[araD139]_{B/r}$, $\Delta(codB-lacI)3$, $\phi80dlacZ58(M15)$, $galk0$, $mcrA0$, $galU-$, $recA1$, $endA1$, $nupG-$, $rpsL-(strR)$, $\Delta(mcrC-mrr)715$	(Edwards, A.N. y col., 2011)
GM119	$fhuA2$ or $fhuA31$, $lacY1$ or $lacZ4$, $tsx-1$ or $tsx-78$, $glnX44(AS)$, $galk2(Oc)$, $galT22$, λ^- , $dcm-6$, $dam-3$, $mtlA2$, $metB1$, $thiE1$	(Arraj, J.A. y Marinus, M.G., 1983)

1.1.1.2- *Agrobacterium tumefaciens*.

Las cepas de *A. tumefaciens* (Tabla 2) se utilizaron para la transformación estable de *Arabidopsis* y tomate, y para la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

Tabla 2. Cepas utilizadas de *A. tumefaciens*.

Cepa	Genotipo	Referencia
GV3101	<i>Rif^R pMP90 (pTiC58CT-DNA)</i>	(Koncz, C. y Schell, J., 1986)

1.1.2- MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Para el cultivo de las cepas de *E. coli* se utilizó el medio Luria-Broth (LB) (Tabla 3), suplementado en los casos en que fuese necesario, con el antibiótico selectivo correspondiente: ampicilina (100 mg/L); kanamicina (50 mg/L); estreptomycin (25 mg/L).

Todos los medios preparados en esta Tesis Doctoral se esterizaron en autoclave, en condiciones de sobrepresión de 1 atmósfera y 120 °C durante 20 minutos. Las excepciones de esterilización son indicadas en cada caso.

El cultivo de *E. coli* se realizó a 37 °C y en el caso de cultivo en medio líquido, se incubaba a 37 °C y agitación.

Tabla 3. Composición de medio LB.

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

* Se adicionaba para preparar el medio en estado sólido.

Para el cultivo de *A. tumefaciens* se utilizó el medio LB (Tabla 3), suplementado en los casos en que fuese necesario, con el antibiótico selectivo correspondiente. La temperatura de cultivo fue de 28 °C, y en el caso de cultivo en medio líquido, se incubaban a 28 °C y en agitación.

Para el mantenimiento a largo plazo de las cepas de *E. coli* que contenían plásmidos de interés, se almacenaba a -80 °C, 1 mL de suspensión de células en medio de cultivo con un 20 % de glicerina estéril.

1.2- LEVADURAS.

1.2.1- CEPAS UTILIZADAS.

Las cepas de levadura *S. cerevisiae* utilizadas (Tabla 4) se describen a continuación.

Tabla 4. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Referencia
9.3	<i>MATα, ena1D::HIS3::ena4D, leu2, ura3-1, trp1-1, ade2-1, trk1D, trk2::pCK64</i>	(Bañuelos, M.A. y col., 1995)
MaV203	<i>MATα, leu2-3,112, trp1-901, his3Δ200, ade2-101, gal4Δ, gal80Δ, SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3_{UAS}, GAL1::HIS3@LYS2, can1R, cyh2R</i>	(Vidal, M. y col., 1996)

La cepa **9.3** es deficiente en los transportadores de entrada de K⁺ TRK1 y TRK2, y en las bombas de salida de Na⁺ Ena1-Ena4 (Bañuelos, M.A. y col., 1995). Esta cepa se ha utilizado en esta Tesis Doctoral para la caracterización de sistemas implicados de absorción de K⁺.

La cepa **MaV203** posee las características genotípicas necesarias para llevar a cabo el ensayo de doble híbrido en levadura.

1.2.2- MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Los procedimientos de crecimiento y propagación de *S. cerevisiae* se realizaron en medio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) (Tabla 5) (Frederick M. Ausubel, R.B., Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, y Struhl, K., 2002).

Tabla 5. Composición del medio YPD de levadura.

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

* Se adicionaba para preparar el medio en estado sólido.

Como medio selectivo, se utilizó SD (*Sherman Dextrose*) (Tabla 6) (Sherman, F., 1991), excluyendo la adición del aminoácido apropiado para seleccionar los transformantes.

Tabla 6. Composición del medio SD de levadura.

YNB	0,67 % (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 % (p/v)
Glucosa	2 % (p/v)
Agar Bacteriológico*	2 % (p/v)

* Se adicionaba para preparar el medio en estado sólido.

Para los ensayos de crecimiento de levaduras en condiciones de bajo K⁺, se utilizó el medio Fosfato de Arginina (PA) (Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J., 1984), cuya composición es detallada en las Tablas 7, 8 y 9.

Tabla 7. Composición del medio PA de levadura.

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

*Oligoelementos (Stock 1000X) (Tabla 8).

**Vitaminas (Stock 100X) (Tabla 9), se adicionaron tras la esterilización del medio PA.

***Se adicionaba para preparar el medio en estado sólido.

Tabla 8. Composición del stock de oligoelementos 1000X.

H ₃ BO ₃	50 mg/L
CuSO ₄	4 mg/L
KI	10 mg/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	40 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	20 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4 mg/L
FeSO ₄	50 mg/L

Tabla 9. Composición del stock de vitaminas 100X.

Tiamina (Vit. B1)	4 mg/100 mL
Ácido nicotínico (Vit.B3)	4 mg/100 mL
Ácido pantoténico (Vit.B5)	4 mg/100 mL
Piridoxina (Vit.B6)	4 mg/100 mL
Biotina (Vit.B7)	2 mg/100 mL

La solución de vitaminas se esterilizaba mediante filtración.

Materiales y Métodos

El medio se suplementaba con la concentración de KCl indicada en cada caso, según el ensayo a realizar.

1.3- MATERIAL VEGETAL.

1.3.1- *Arabidopsis thaliana*.

El trabajo experimental realizado con *Arabidopsis* se ha llevado a cabo con el ecotipo Columbia (Col-0). Se han empleado plantas silvestres (WT) y plantas homocigóticas de los mutantes simples, dobles y triple, de los genes del canal AKT1, del transportador AtHAK5, y de la proteína quinasa AtCIPK23. También se ha utilizado la línea del mutante homocigótico del canal rectificador de salida de K⁺ AtSKOR. (Tabla 10).

Tabla 10. Líneas utilizadas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0.

Línea	Origen
Silvestre	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i> (ABRC)
<i>hak5-3</i>	Este laboratorio (Rubio, F. y col., 2008)
<i>akt1-2</i>	Este laboratorio (Rubio, F. y col., 2008)
<i>cipk23-5</i>	Este laboratorio (Nieves-Cordones, M. y col., 2012)
<i>hak5-3 akt1-2</i>	Este laboratorio (Rubio, F. y col., 2010)
<i>hak5-3 cipk23-5</i>	Esta Tesis (Anexo 4.1)
<i>akt1-2 cipk23-5</i>	Esta Tesis (Anexo 4.2)
<i>hak5-3 akt1-2 cipk23-5</i>	Esta Tesis (anexo 4.3)
<i>skor-1</i>	(Gaymard, F. y col., 1998)

1.3.1.1-Cultivo y crecimiento.

1.3.1.1.1- Esterilización de semillas.

Las semillas de Arabidopsis fueron esterilizadas en cabina de flujo laminar (TELSTAR Mini-H) con una mezcla desinfectante de alcohol etílico al 70 %, seguido de lejía comercial al 0,5 % y SDS (Dodecil Sulfato Sódico) al 0,1 %, durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se sometieron a 5 lavados con agua esterilizada para eliminar la mezcla desinfectante, quedando suspendidas en el agua del quinto lavado. Se almacenaron a 4 °C durante 12 h en oscuridad.

1.3.1.1.2- Cultivo en hidropónico.

El desarrollo de las plántulas y la realización de los experimentos se llevaron a cabo en cultivo hidropónico (Gibeaut, D.M. y col., 1997), en una cámara de cultivo con las condiciones de luz, temperatura y humedad controladas.

Una vez esterilizadas las semillas, se germinaban sobre lana de roca, material inerte que permite un fácil crecimiento de la raíz a través del mismo. La lana de roca se insertaba en microtubos de 1,5 mL, para lo cual se cortaron la tapa y la punta de los mismos (Figura 10A). Estos microtubos se insertaban en planchas de PVC (policloruro de vinilo), a las que previamente se les había realizado perforaciones con el diámetro de los tubos, que se encajaban sobre cubetas de 2,5 L que contenían la solución nutritiva (SN) (Figura 10B y 10C).

Se fijó un fotoperiodo de 8 h de luz, 22 °C de temperatura y una humedad relativa del 65 %. Como sistema de iluminación se utilizaron tubos fluorescentes Philips TLD 36/W 83, Silvana F 36WGRO), consiguiendo una densidad homogénea del flujo de fotones de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 10D).

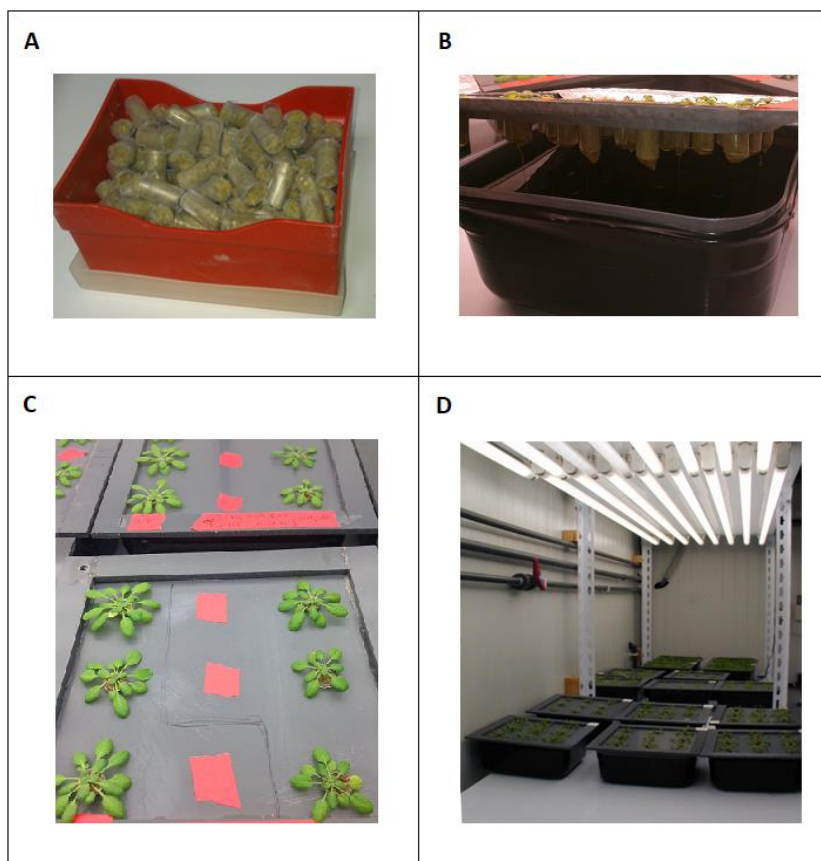


Figura 10. Detalle del sistema de crecimiento de Arabidopsis en cultivo hidropónico y cámara de cultivo con iluminación, temperatura y humedad controladas. A) Microtubos de 1,5 mL con lana de roca donde se germinan las semillas. B) Placas de PVC donde se insertan los microtubos de 1,5mL con lana de roca, que se encajan sobre cubetas de 2,5 L con la solución nutritiva. C) Crecimiento de Arabidopsis en el sistema de cultivo hidropónico. D) Cámara de cultivo con las condiciones controladas, donde se puede observar el sistema de iluminación.

La SN utilizada consistió en una modificación de la solución Hoagland (Hoagland, D.R. y Arnon, D.I., 1950), cuya composición se recoge en la Tabla 11. Se llevaron a cabo distintas diluciones de la SN y variaciones en los compuestos según el experimento a realizar, cambios que son indicados en cada caso. El pH de la solución se ajustaba a 5,5 mediante la adición de H_2SO_4 .

Tabla 11. Macronutrientes y micronutrientes que componen la SN de Hoagland modificada.

	Compuesto	Concentración
Macronutrientes	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,4 mM
	$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,35 mM
	KCl	1,4 mM
	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 mM
	Fe-EDDHA	10 μM
Micronutrientes	H_3BO_3	12,5 μM
	MnSO_4	1 μM
	ZnSO_4	1 μM
	CuSO_4	0,5 μM
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,1 μM
	NiSO_4	0,1 μM

1.3.1.1.3- Cultivo en suelo.

El crecimiento de *Arabidopsis* en suelo se llevó a cabo únicamente para la propagación de plantas y recolección de semillas.

Como sustrato se utilizó una mezcla de turba negra, vermiculita y perlita en proporciones (3:2:1), esterilizada previamente en el autoclave.

1.3.1.1.4- Recolección de semillas.

Cuando empezaban a brotar las inflorescencias, las plantas se protegían con colectores de semillas comerciales *Aracons*TM (Arasystem-Betatech) (Figura 11). Al presentar silicuas maduras, se detenía el riego de las mismas para su desecación. Cuando la desecación era total, se cortaban las inflorescencias por la base y se procedía a la apertura mecánica de las silicuas, recogiendo el total de las semillas mediante tamizaciones sucesivas.



Figura 11. Plantas de *Arabidopsis* con colectores de semillas *Aracons*[™] (Arasystem-Betatech).

1.3.2- *Solanum lycopersicum*.

Los ensayos con plantas de tomate se han llevado a cabo con el cultivar Micro-Tom, a excepción del estudio transcriptómico mediante RNA-seq, que se realizó con el cultivar Boludo.

1.3.2.1-Cultivo y crecimiento.

1.3.1.1.1- Cultivo en hidropónico.

El cultivo de las plantas de tomate para la realización de los experimentos se llevó a cabo en medio hidropónico. Las semillas se pre-hidrataban con aireación en una solución de CaSO_4 durante 72 h y se germinaban a 28 °C en bandejas de 3-4 cm de profundidad con vermiculita, previamente humedecida con la solución de pre-hidratación (Figura 12A). Las semillas tardaban en germinar entre 4 y 6 días y cuando las plántulas alcanzaban un tamaño de 3-4 cm, se transferían a contenedores de 18 L con el mismo SN Hoagland modificada, descrito para *Arabidopsis* (ver Tabla 11) y aireación (Figura 12B).

Los contenedores se disponían en una cámara de cultivo con condiciones controladas, fotoperiodo de 16 h de luz, temperatura de 25 °C y humedad de 65 % durante el día, y de 20 °C y 85 %, respectivamente, por la noche. El sistema de iluminación empleado consistió en una combinación de tubos fluorescentes (Philips TLD 36/W83, Silvana F 36WGRO) y lámparas de vapor de sodio (Oosram HQI. T 400W), consiguiendo una densidad homogénea de flujo de fotones de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 12C).



Figura 12. Detalle del sistema de crecimiento de plantas de tomate en cultivo hidropónico y cámara de cultivo con iluminación, temperatura y humedad controladas. A) Se muestra la pre-hidratación de semillas de tomate en matraces con solución CaSO_4 y aireación; y la bandeja con vermiculita donde se disponían las plántulas cuando alcanzaban los 3-4 cm. B) Cubetas de 18 L con SN de Hoagland modificada y sistema de aireación. C) Cámara de cultivo con las condiciones controladas, donde se observa el sistema de iluminación, compuesto por tubos fluorescentes y lámparas de sodio.

1.3.3- *Nicotiana benthamiana*.

Se utilizaron las hojas de *N. benthamiana* para la expresión transitoria de proteínas tras su transformación con *A. tumefaciens*.

1.3.3.1-Cultivo y crecimiento.

1.3.3.1.1- Cultivo en suelo.

Las plantas de *N. benthamiana* fueron cedidas por el departamento de Patología Vegetal del CEBAS-CSIC, donde se cultivaron en recipientes individuales con una mezcla constituida por 60 % de sustrato Projar Seed Pro 5050 (50 % turba negra y 50 % turba rubia fina, Von Post), 30

Materiales y Métodos

% fibra de coco y 10 % zeolita, en cámaras de cultivo bajo un régimen de día largo (16/8 h de luz/oscuridad), a 25/18 °C y 70 % de humedad (Figura 13).



Figura 13. Cultivo de *N. benthamiana* en cámara de cultivo con las condiciones controladas.

2- MÉTODOS

2.1- MANIPULACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1.1- Métodos de cruzamiento

2.1.1.1-Cruzamiento de líneas de Arabidopsis.

Para realizar el cruzamiento entre dos estirpes de interés de *A. thaliana*, se siguió el protocolo descrito a continuación (Kranz, A.R.Y.K., B., 1987).

Se eligió un grupo de botones florales situado en el ápice de un tallo de inflorescencia de la planta que va a ser la receptora de polen, parental femenino (**f**), y se eliminaron todas las flores maduras, presuntamente autofecundadas; y todos los capullos, a excepción de aquellos cuyos pétalos sean apenas visibles. A estos últimos se les extirparon los sépalos, pétalos, y los estambres inmaduros, obteniéndose flores cuya única estructura funcional es un pistilo no fecundado. Estas manipulaciones se llevaron a cabo con pinzas de microcirugía Aesculap

BD331, previamente esterilizadas mediante su inmersión en alcohol etílico al 95 % y secadas al aire.

De la planta utilizada como donante de polen, el parental masculino (**m**), se extirpó una flor madura que presentara los pétalos abiertos y estambres en cuyas anteras eran visibles los granos de polen.

Con las pinzas, se realizó una presión a la altura de los sépalos, poniendo en contacto varias de sus antenas, una por una, con el pistilo de la flor receptora del polen. El cruce se señaló adhiriendo al tallo, junto a la flor fecundada manualmente, una etiqueta indicando el genotipo del parental masculino empleado.

La planta fecundada se llevó a la cámara de cultivo, donde permaneció hasta la formación y maduración de la silicua, que fue recogida y depositada en un microtubo de 1,5 mL, etiquetado adecuadamente con los genotipos cruzados.

La recolección de las semillas obtenidas de todas las silicuas de la planta fecundada, se llevó a cabo presionando manualmente la silicua seca sobre un papel de filtro, al que cayeron las semillas, junto a restos de fragmentos de silicuas y otras partes de la planta. Mediante sucesivas tamizaciones se eliminaron las partículas de un tamaño mayor a las semillas.

Los cruzamientos de líneas de Arabidopsis realizados en esta Tesis Doctoral se detallan en el Anexo 4.

2.1.2- Métodos de caracterización.

2.1.2.1- Caracterización de la absorción de K^+ por raíces de plantas de Arabidopsis.

2.1.2.1.1- Caracterización de la absorción de K^+ en el rango de *baja* afinidad: Ensayo de absorción de Rb^+ del medio externo.

Para caracterizar la capacidad de absorción de K^+ por raíces de Arabidopsis en el rango de *baja* afinidad, se llevó a cabo un experimento que consistió en determinar la capacidad de las raíces de absorber el Rb^+ , análogo del K^+ , presente en un medio externo donde se había añadido una concentración conocida del mismo. Estos experimentos se realizaron en la

Materiales y Métodos

cámara de cultivo, bajo condiciones controladas, siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Las raíces de las plantas se lavaban en SN Hoagland modificada sin K^+ a 4 °C, y se transferían a cubetas donde las raíces quedaban sumergidas en SN Hoagland modificada sin K^+ , suplementada con 1,4 mM de Rb^+ (concentración en el rango de baja afinidad). Transcurridas 7 horas con las raíces sumergidas en la solución externa, las raíces se lavaron con agua destilada fría, para eliminar los cationes del apoplasto, se cosecharon la parte aérea y raíz por separado, y se determinaron los pesos frescos. Tras secar el material vegetal a 65 °C durante 4 días, se determinaron también los pesos secos. El material seco se procesaba como se describe a continuación para determinar la composición mineral del mismo.

2.1.2.1.1.1- Medida del contenido mineral interno.

El análisis mineral de los órganos de la planta se llevó a cabo tras realizar digestiones ácidas del material vegetal con una solución $HNO_3:HClO_4$ (2:1). Para ello, se pesaron 0,1 g de material vegetal (y en su defecto, la cantidad total disponible), a los que se adicionaron 2 mL de la solución nítrico-perclórica y se dispusieron en tubos adecuados para llevar a cabo el proceso de digestión. Se colocaron en un digestor a 90 °C durante 1 h, seguido de 120 °C durante 4 h. A continuación, se aumentó la temperatura a 180 °C durante 2 h y finalmente, a 210 °C hasta la decoloración de la muestra y contener un volumen de aproximadamente 0,5 mL. Una vez que se enfriaban, se añadía agua destilada hasta 10 mL.

Las concentraciones de iones se determinaron mediante espectrometría de ICP (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation). Los datos de concentración de iones se expresaron en milimoles de ion por gramo ($mmol\ g^{-1}$) de peso fresco o seco de material vegetal, y se calcularon las medias y errores estándar.

Para determinar las concentraciones internas de NO_3^- se siguió el método utilizado por (Abbas, M.A. y col., 1991). Se partía de 0,05 g de material vegetal, al que se le añadían 10 mL de agua desionizada MilliQ® (Millipore®) y se sometió a agitación mecánica durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaban las muestras a $4.697\ x\ g$ durante 20 min y 1 mL del sobrenadante, se añadía a 4 mL de agua desionizada y se filtraba a través de un filtro de diámetro de 0,45 μm . A 3 mL del filtrado, se le añadían 9 mL de agua MilliQ®. El extracto

obtenido se utilizó para la determinación mediante cromatografía iónica, mediante la utilización de un cromatógrafo Dionex modelo DX-100.

2.1.2.1.1.2- Tasas de absorción de Rb^+ y de translocación de la raíz a la parte aérea.

Una vez obtenidas las concentraciones de los iones presentes en los distintos órganos, la tasa de absorción de Rb^+ por las raíces de las plantas sometidas al ensayo de absorción, se calculó como el total de Rb^+ en la planta por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo.

La tasa de translocación de Rb^+ de la raíz a la parte aérea se calculó como el total de Rb^+ presente en la parte aérea por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo.

2.1.2.1.2- Caracterización de la absorción de K^+ en el rango de *alta* afinidad: Ensayo de desaparición de Rb^+ del medio externo.

Para caracterizar la capacidad de absorción de K^+ por raíces de Arabidopsis en el rango de *alta* afinidad, se llevó a cabo un experimento que consistió en determinar la velocidad de desaparición de Rb^+ de un medio externo donde se había añadido una concentración conocida del mismo. Estos experimentos se realizaron en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas, siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Las raíces de las plantas se lavaban en SN Hoagland modificada sin K^+ a 4 °C, y se transferían a tubos de 50 mL, donde las raíces quedaban sumergidas en SN Hoagland modificada sin K^+ , suplementada con 50 μ M de Rb^+ (rango de alta afinidad) (Figura 14). Nada más transferir las plantas, se tomaba una muestra de la solución externa de cada planta, correspondiente a la muestra a tiempo 0 y se fueron tomando muestras cada hora, durante 7 h.



Figura 14. Experimento de desaparición del Rb^+ del medio externo por raíces de Arabidopsis.

Al final de los ensayos, se separaban la parte aérea y raíz de todas las plantas, lavándose la raíz en agua destilada fría, para eliminar los iones del apoplasto, y se determinaban los pesos frescos. A continuación, se secaba el material vegetal en una estufa a 65 °C durante 4 días y se determinaban los pesos secos. Según los casos, las muestras de material vegetal seco se sometieron a análisis mineral.

2.1.2.1.2.1- Tasa de absorción de Rb^+ .

Para determinar la capacidad de absorción de las raíces en el rango de alta afinidad, se midieron las concentraciones de Rb^+ de las muestras de solución externa tomadas como se describe en el apartado anterior, mediante espectrometría de emisión atómica usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo ICP 500.

En una gráfica se representó la concentración de Rb^+ presente en la solución externa en función del tiempo, y se calculó la velocidad de absorción de Rb^+ como la diferencia de Rb^+ total de la solución externa del ensayo entre dos puntos dentro de la parte lineal de la curva de desaparición de Rb^+ , por gramo de peso seco de raíz por hora.

2.1.2.1.2.2- Medida del contenido mineral interno.

Las concentraciones internas de iones se determinaron de igual forma que en el ensayo de caracterización de baja afinidad (ver apartado 2.1.2.1.1.1).

2.1.2.2- Caracterización de la absorción de K^+ por raíces de plantas de tomate.

2.1.2.2.1- Caracterización de la absorción de K^+ en el rango de *baja* afinidad: Ensayo de desaparición de K^+/Rb^+ del medio externo.

Para caracterizar la capacidad de absorción de K^+ por raíces de tomate en el rango de *baja* afinidad, se llevó a cabo un experimento que consistió en determinar la velocidad de desaparición de K^+ (o Rb^+) de un medio externo donde se había añadido una concentración conocida del mismo. Estos experimentos se realizaron en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas, siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Las raíces de las plantas se lavaban en SN Hoagland modificada sin K^+ y fría, y se transferían a vasos de 250 mL, donde las raíces quedaban sumergidas en SN Hoagland modificada sin K^+ , suplementada con 1,4 mM de K^+/Rb^+ y con aireación individual (Figura 15). Nada más transferir las plantas, se tomaba una muestra de la solución externa de cada planta, correspondiente a la muestra a tiempo 0 y se fueron tomando muestras cada 3 h durante 9 h.

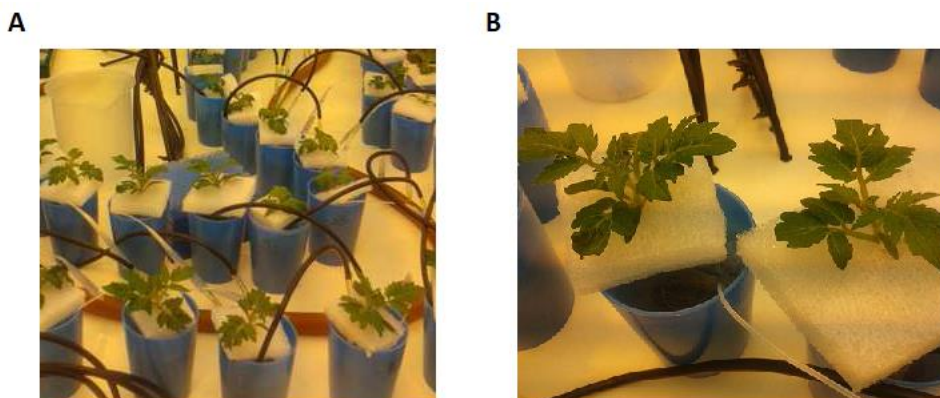


Figura 15. Sistema empleado para el ensayo de desaparición del K^+/Rb^+ externo por raíces de plantas de tomate. En la Figura B se observa una muestra individual, ampliada de la Figura A.

Al final de los ensayos, se separaban la parte aérea y raíz de todas las plantas, lavándose la raíz en agua destilada fría, para eliminar los iones del apoplasto, y se determinaban los pesos frescos. A continuación, se secaba el material vegetal en una estufa a 65 °C durante 4 días y se determinaban los pesos secos. El material vegetal seco se procesaba según se indica a continuación para determinar su composición mineral.

2.1.2.2.1.1- Tasas de absorción y de translocación de K⁺ de la raíz a la parte aérea.

Para determinar la capacidad de absorción de K⁺ o Rb⁺ de las raíces en el rango de baja afinidad, se midieron las concentraciones de K⁺/Rb⁺ de las muestras de solución externa, mediante espectrometría de emisión atómica usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo ICP 500.

Se representó en una gráfica la variación de la concentración de K⁺/Rb⁺ presente en la solución externa en función del tiempo, y se calculó la velocidad de absorción de K⁺/Rb⁺ como la diferencia en el K⁺/Rb⁺ total de la solución externa entre dos puntos en los que la curva de desaparición del catión era lineal, por gramo de peso seco de raíz por hora.

Para profundizar en la caracterización de la absorción de K⁺, se llevó a cabo un ensayo basado en el análisis mineral de los tejidos. Se cultivaron 30 plantas siguiendo las condiciones de cultivo descritas, de las cuales, 6 fueron recogidas antes de aplicar los tratamientos y se denominaron plantas a tiempo 0 (T₀). El resto de plantas (T₁) se sometieron durante 7 días a los distintos tratamientos (6 plantas por tratamiento) y se cosecharon para determinar la composición mineral, de igual forma que las plantas T₀. La absorción de K⁺ se calculó en base a la concentración interna de K⁺ en las plantas de tomate según la siguiente fórmula:

$$\text{Absorción de K}^+ = \frac{K_{t1} - K_{t0}}{(R_{t1} + R_{t0})/2}$$

Donde:

K_{t0}= contenido total de K⁺ antes de iniciar los tratamientos,

K_{t1}= contenido total de K⁺ tras aplicar el tratamiento,

R_{t0}= peso seco de raíz antes de iniciar los tratamientos,

R_{t1} = peso seco de raíz tras finalizar el tratamiento.

Utilizando las concentraciones de K^+ obtenidas de las plantas T_0 y T_1 ya mencionadas, se calculó la translocación de K^+ de raíz a la parte aérea mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Translocación de } K^+ = \frac{K_{PA_{t1}} - K_{PA_{t0}}}{(R_{t1} + R_{t0})/2}$$

Donde:

$K_{PA_{t0}}$ = contenido total de K^+ en parte aérea antes de iniciar los tratamientos,

$K_{PA_{t1}}$ = contenido total de K^+ en parte aérea tras finalizar el tratamiento,

R_{t0} = peso seco de la raíz antes de iniciar los tratamientos,

R_{t1} = peso seco de la raíz de tras finalizar el tratamiento.

2.1.2.2.1.2- Medida del contenido mineral interno.

Para determinar las concentraciones internas de iones en las partes aéreas y raíces, se llevó a cabo el análisis mineral de los órganos de la planta tras realizar digestiones ácidas de igual forma que se describe para Arabidopsis (ver apartado 2.1.2.1.1.1)

2.1.2.2.2- Caracterización de la absorción de K^+ en el rango de *alta* afinidad: Ensayo de desaparición de K^+ / Rb^+ del medio externo.

Para caracterizar la capacidad de absorción de K^+ por raíces de tomate en el rango de *alta* afinidad, se llevó a cabo el mismo experimento de desaparición de K^+ / Rb^+ del medio externo, pero a con concentración externa de 100 μ M (rango de alta afinidad). Se llevó a cabo el mismo protocolo de preparación del ensayo, con la excepción de que se tomaban muestras cada 15 min durante 3 h.

Materiales y Métodos

Al final de los ensayos, se separaban la parte aérea y raíz de todas las plantas, lavándose la raíz en agua destilada fría, para eliminar los iones del apoplasto, y se determinaban los pesos frescos. A continuación, se secaba el material vegetal en una estufa a 65 °C durante 4 días y se determinaban los pesos secos. El material vegetal seco se procesaba según se indica a continuación para determinar su composición mineral.

2.1.2.2.2.1- Tasa de absorción de K^+/Rb^+ en el rango de alta afinidad.

Para determinar la capacidad de absorción de las raíces en el rango de alta afinidad, se midieron las concentraciones de K^+/Rb^+ de las muestras de solución externa, mediante espectrometría de emisión atómica usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo ICP 500.

Se representó en una gráfica la concentración de K^+/Rb^+ presente en la solución externa en función del tiempo, y se calculó la velocidad de absorción de K^+/Rb^+ como la diferencia en el K^+/Rb^+ total de la solución externa entre dos puntos en los que la curva de desaparición del catión era lineal por gramo de peso seco de raíz por hora.

2.1.2.2.2.2- Medida del contenido mineral interno.

La determinación de las concentraciones internas de iones se llevó a cabo de igual forma que en el ensayo de caracterización de baja afinidad de Arabidopsis (ver apartado 2.1.2.1.1.1).

2.1.2.2.3- Medida del potencial de membrana.

Se determinó el potencial de membrana de las células de la epidermis o corticales de la raíz de plantas de tomate mediante la utilización de microelectrodos de borosilicato (Maathuis, F.J. y Sanders, D., 1994). Las plántulas se montaron en una cámara de poliestireno acoplada a la platina de un microscopio (Figura 16). En la cámara se disponían las raíces, quedando bañadas con una solución control (10 mM de MES-Ca pH 6,1) a una velocidad de perfusión de 10 mL min⁻¹. Con la ayuda de un micromanipulador, los microelectrodos simples

de borosilicato (1B120F-4, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL) se introducían en las primeras capas de células de raíz hasta obtener un potencial estable. Cada capilar se introducía en un portaelectrodos (MEHF1S10, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL) que contenía una semicélula Ag/AgCl, y se conectaban a un amplificador de alta impedancia (DUO 773, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL).

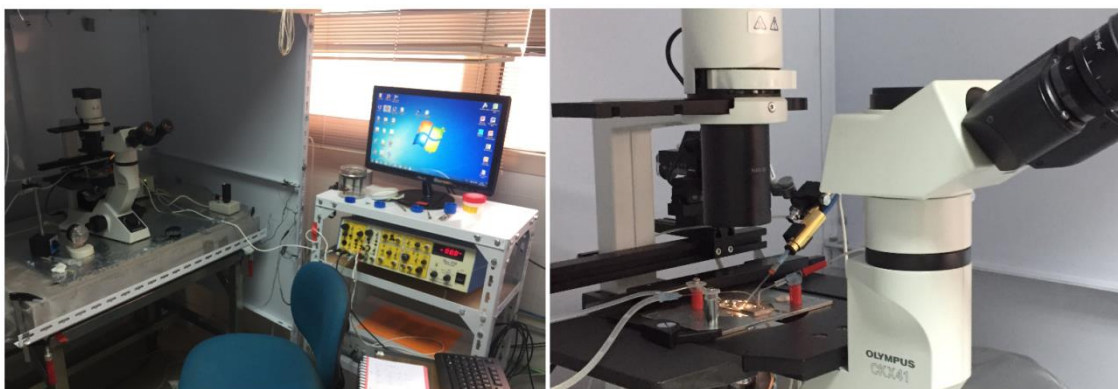


Figura 16. Sistema para llevar a cabo los registros de potencial de membrana en las células de raíz de tomate. A) Cabina de Faraday conteniendo el microscopio y el micromanipulador, y el amplificador situado en el exterior. B) Imagen ampliada del microscopio, donde se observan los microelectrodos y la semicélula Ag/AgCl.

2.1.2.3- Caracterización de la absorción de K⁺ por *S. cerevisiae*.

2.1.2.3.1- Ensayo de crecimiento en medio sólido.

Para caracterizar el crecimiento de los distintos transformantes de *S. cerevisiae* bajo estudio, se preparaban placas de PA suplementadas con distintas concentraciones de KCl, con el objetivo de observar su capacidad de formar colonias.

Los cultivos de células se incubaban previamente en medio YPD sólido con K⁺ suficiente, para el crecimiento de las cepas. Cuando el cultivo estaba suficientemente crecido, se determinaba su densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) y se realizaban diluciones seriadas para llegar a suspensiones con densidades ópticas (DO₆₀₀) de: 1, 0,1, 0,01 y 0,001. Se sembraban gotas de 10 µL en el medio PA sólido suplementado con las distintas concentraciones de KCl. Las placas se incubaban a 28 °C durante un periodo de tiempo variable, dependiendo del fenotipo (entre 3-5 días).

2.1.2.3.2- Ensayo de transporte iónico.

Para determinar la capacidad de absorber K^+ por los transformantes bajo estudio, se realizaron experimentos de acumulación de Rb^+ desde un medio externo que contenía concentraciones conocidas del mismo.

Las cepas se crecían durante 14 horas a 28 °C y agitación en 50 mL de medio PA líquido, suplementado con 100 mM de K^+ , hasta obtener una DO_{600} de 0,3. Las células se recogían por centrifugación a 7.828 x *g* durante 10 min, se sometían a dos lavados con agua bidestilada, se suspendían en medio PA fresco sin K^+ y se incubaban durante 6 h a 28 °C y agitación. Transcurrido este periodo de ayuno de K^+ , se transferían a 50 mL de tampón (10 mM de MES y 0,1 mM de $MgCl_2$, ajustado a pH 6,0 con $Ca(OH)_2$), suplementado con 2 % de glucosa antes del ensayo, y distintas concentraciones de Rb^+ (que constituían el tiempo 0).

Se tomaban muestras de células a intervalos regulares, filtrando un volumen (5-10 mL) de cultivo, mediante el uso de filtros (Millipore® de diámetro de poro de 0,8 μm) conectados a una bomba de vacío. Los filtros con las células se lavaban externamente 2 veces con 5 mL de una solución 20 mM de $MgCl_2$. Para la extracción de los cationes celulares, los filtros se incubaban en tubos de 10 mL con 5 mL de una solución 0,1 mM de HCl y 10 mM de $MgCl_2$, durante toda la noche. Posteriormente, los tubos se centrifugaban para depositar los restos celulares y se determinaba la concentración de Rb^+ en la solución con un espectrómetro de absorción atómica, en el modo de emisión. A partir de estos datos se calculaban los contenidos de Rb^+ interno por gramo de peso seco de levadura, deducido de la DO del cultivo, y unidad de tiempo, obteniéndose la velocidad de entrada de Rb^+ en $nmol\ mg^{-1}\ mim^{-1}$.

2.1.3- Métodos de transformación.

Los vectores utilizados se recogen en el Anexo 3.

2.1.3.1-Transformación de bacterias.

2.1.3.1.1- Preparación de células competentes.

2.1.3.1.1.1- Preparación de células competentes de *E. coli*.

Para llevar a cabo la preparación de las células competentes de *E. coli*, se siguió el protocolo descrito a continuación:

Se inoculó una colonia, procedente de una placa donde se había incubado la bacteria a 37 °C el día anterior, en 3 mL de medio LB líquido y se incubó toda la noche a 37 °C y agitación. Al día siguiente, 100 µL procedentes del cultivo, se añadieron a 20 mL de medio LB fresco y se incubó de nuevo toda la noche a 37 °C y agitación. Se añadieron 12 mL del cultivo a 1,2 L de medio LB nuevo (precalentado a 37 °C antes de añadir el cultivo). A continuación, se sometió a agitación vigorosa hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6-0,7 (lo que llevaba entre 5 y 7 h aproximadamente). Las células se incubaron en hielo durante 30 min para detener el crecimiento y a partir de ese momento, el protocolo se llevó a cabo con todo el material en frío. Se centrifugaron las células a $4000 \times g$ durante 15 min y se suspendieron en un volumen de agua estéril fría igual al volumen de LB de partida. Se volvieron a centrifugar las células y se resuspendieron en la mitad del volumen inicial de agua estéril fría. Tras la última centrifugación, se resuspendieron en 10 mL de agua estéril, por cada litro de volumen inicial de células al 10 % de glicerina estéril fría. La solución de células resultante se dispensó en alícuotas de 40- 60 µL que se congelaron instantáneamente en nitrógeno (N_2) líquido, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

2.1.3.1.1.2- Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*.

Para llevar a cabo la preparación de las células competentes de *A. tumefaciens*, se siguió el protocolo descrito a continuación (Holsters, M. y col., 1978).

Se inoculó una colonia de la línea GV3101 en 5 mL de medio LB y se incubó toda la noche a 28 °C. Se tomaron 2 mL de ese cultivo y se inocularon en 80 mL de medio LB nuevo, hasta alcanzar una DO_{600} de entre 0,5 y 1.

Las células se recogieron por centrifugación a $3000 \times g$ y 4 °C durante 10 min, tras lo cual se lavaban con la mitad del volumen de glicerina al 10 % (v/v) previamente esterilizada y

enfriada. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones más, suspendiendo las células en 4,5 mL en el primer paso, y en 1,5 mL en el paso final. Finalmente, las células se dispensaron en alícuotas de 50 μ L que se congelaron inmediatamente con N₂ líquido, y se almacenaron a -80 °C.

2.1.3.1.2- Transformación de *E. coli*.

La transformación de células competentes de *E. coli* se llevó a cabo mediante electroporación.

Una mezcla de las células competentes y el ADN a transformar, se introdujo en una cubeta de electroporación de 0,2 cm y se le aplicó un pulso de 3 kV, 25 μ F, 200 Ω y aproximadamente 5 milisegundos de duración en un electroporador GenePulser® MicroPulser™ (BioRad, Hercules CA, EEUU). Se añadieron rápidamente 800 μ L de medio LB líquido y la mezcla se incubó a 37 °C y agitación durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron tras una centrifugación a 7.828 x *g* y se extendieron en LB sólido con el antibiótico de selección correspondiente. Como control positivo de transformación, se adicionaron 20 ng del plásmido pUC18.

2.1.3.1.3- Transformación de *A. tumefaciens*.

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* se llevó a cabo mediante electroporación.

Una mezcla de las células competentes y el ADN a transformar, se introdujo en una cubeta de electroporación de 0,15 cm y se le aplicó un pulso de 3 kV, 330 μ F, 4000 Ω y aproximadamente 5 milisegundos de duración en un electroporador GenePulser® MicroPulser™ (BioRad). Se añadieron rápidamente 800 μ L de medio LB líquido y la mezcla se incubó a 28 °C y agitación durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron tras una centrifugación a 7.828 x *g* y se extendieron en LB sólido con el antibiótico de selección correspondiente.

2.1.3.2- Transformación de *S. cerevisiae*.

Para transformar las cepas de *S. cerevisiae*, se utilizaba el método de ‘acetato de litio’ (Elble, R., 1992).

Se inoculaba una colonia de la estirpe apropiada en 10 mL de medio YPD, suplementado con 100 mM K⁺ para evitar la reversión de la cepa 9.3, y se incubaba toda la noche a 28 °C en agitación suave. Tras alcanzar una DO₆₀₀ de 1,5-2, las células se recogían mediante centrifugación y se les añadía entre 1 y 2 µg de ADN y 500 µL de solución PLATE (Tabla 12), mezclando suavemente.

Tabla 12. Composición de la solución PLATE para la transformación de *S. cerevisiae*.

PEG (MW 3350)	40 % (v/v)
Acetato de litio	100 mM
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

Las células se incubaban en esa solución durante 24 h a temperatura ambiente y transcurrido ese periodo, la mezcla se centrifugaba 6.262 x *g* para recoger las células, se lavaban en dos pasos con agua estéril, centrifugándose entre cada paso. Las células recogidas en el último lavado se extendían en las placas con medio selectivo y se incubaban a 28 °C durante 48 h.

2.1.3.3- Transformación de plantas.

2.1.3.3.1- Transformación transitoria de *N. benthamiana*.

Para una infiltración eficiente de las plantas, éstas debían tener entre 5 y 6 semanas y encontrarse bien hidratadas en el momento de la transformación.

Materiales y Métodos

La agroinfiltración de *N. benthamiana* se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación (Waadt, R. y Kudla, J., 2008).

Se inoculaba una colonia de *A. tumefaciens* con la construcción de interés en 5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos selectivos correspondientes y se crecía toda la noche a 28 °C y agitación suave. En paralelo, se realizaba el mismo procedimiento con la línea p19.

Al día siguiente, se medía la DO₆₀₀ de los cultivos y se calculaban los volúmenes necesarios para obtener una DO₆₀₀ en la mezcla de transformación final de 0,5 para las líneas con las construcciones de interés y de 0,3 para la línea p19, siguiendo la fórmula:

$$V_{\text{inicial}} = \frac{V_{\text{final}} \times DO_{\text{final}}}{DO_{\text{inicial}}}$$

Donde:

V_{final} = volumen final deseado.

DO_{final} = la DO₆₀₀ deseada en la mezcla de transformación final.

DO_{inicial} = la DO₆₀₀ medida en cada mezcla de cultivo tras su incubación.

A continuación, se añadían los volúmenes de ambos cultivos al mismo tubo Falcon® y se centrifugaban a 7.828 x g durante 15 min. Se eliminaba el sobrenadante y las células se resuspendían en el volumen final deseado en el tampón final de activación (Tabla 13). La mezcla se incubaba 3 h a temperatura ambiente.

Tabla 13. Composición del tampón de activación.

MES	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Acetosiringona	150 µM

Tras este periodo, se infiltraba el envés de las hojas de *N. benthamiana* con la mezcla de transformación mediante el uso de jeringuillas de 5 mL sin aguja, asegurando una distribución homogénea de la mezcla por toda la superficie.

2.2- MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

2.2.1- Extracción y análisis de ADN.

Todo el material de vidrio y las soluciones utilizados en estas técnicas se esterilizó por tratamiento en autoclave a 120 °C durante 20 min y 1 atm de sobrepresión antes de su uso. En el caso de soluciones termolábiles, se esterilizó el material por filtración a través de un filtro con tamaño de poro de 0,22 µm. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada Milli Q (Millipore®).

2.2.1.1- Purificación de ADN plasmídico de *E. coli*.

La preparación de plásmidos amplificados en *E. coli* se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Sambrook, J. y Russell, D.W., 2001).

2.2.1.1.1- Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (MINIPREP).

Una colonia de las células de *E. coli* transformada con el plásmido de interés, se incubaba a 37 °C y agitación en 3 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico de selección correspondiente. Tras recoger las células por centrifugación, se resuspendían en un volumen de Solución I (Tabla 14). A la suspensión de células, se le añadían dos volúmenes de la Solución II (Tabla 15) recién preparada, y se mezclaba por inversión con suavidad. A continuación, se añadían 1,5 volúmenes de acetato de potasio 3 M pH 6,0 (Tabla 16), se mezclaba por inversión y se incubaba en hielo durante 10 min.

Tabla 14. Composición de la Solución I.

Tris/ HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	25 mM
Glucosa	10 %(p/v)

Tabla 15. Composición de la Solución II.

NaOH	200 mM
SDS	1%

Mediante centrifugación se separaba el ADN de los restos celulares y se concentraba por precipitación con 2,5 volúmenes de alcohol isopropílico en hielo durante 20 min. Posteriormente, se añadía alcohol etílico al 70 % para lavar y eliminar restos. Tras la última centrifugación, se descartaba el sobrenadante y se dejaba secar el precipitado de ADN, tras lo cual se resuspendía en un volumen adecuado de agua con ARNasa (Roche®) a una concentración de 50 µg mL⁻¹.

Cuando el ADN purificado tenía como objetivo operaciones que requerían un grado de pureza más elevado, se utilizaba el kit comercial de purificación de ácidos nucleicos NucleoSpin®, Plasmid Kit (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

2.2.1.1.2- Purificación de ADN plasmídico a gran escala (MAXIPREP).

Una colonia de las células de *E. coli* transformada con el plásmido de interés, se incubaba a 37 °C y agitación en 100 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico de selección correspondiente. El cultivo se centrifugaba a 7.828 x *g* durante 15 min, y las células se resuspendían en 5 mL de GTE (Tabla 16). La suspensión celular se incubaba en hielo durante 15 min, tras lo cual se añadían 10 mL de Solución II (Tabla 15), mezclándose por inversión suavemente. El lisado celular obtenido se incubaba en hielo durante 15 min y, posteriormente, se añadían 7,5 mL de acetato de potasio 3M pH 4,8, se mezclaba suavemente por inversión y se incubaba en hielo durante 30 min, de forma que precipitaban las proteínas y el ADN cromosómico. Transcurrido este tiempo, se centrifugaban a 21.920 x *g* durante 15 min a 4 °C.

Para eliminar completamente los restos celulares, el sobrenadante se filtraba utilizando una tela filtradora comercial Miracloth (Calbiochem).

Tabla 16. Composición del tampón GTE.

Tris/ HCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Glucosa	1 % (p/v)

A la solución filtrada se le añadía 1 volumen de alcohol isopropílico y se incubaba en hielo durante 20 min, precipitando así los ácidos nucleicos. Los tubos se centrifugaban entonces a 21.920 x *g* durante 15 min a 4 °C, y el precipitado se resuspendía en 2,5 mL de TE (Tabla 17). Posteriormente, se añadían 2,5 mL de LiCl 6 M a la mezcla, y se incubaban en hielo durante 15 min, precipitando el ARN presente. Se centrifugaban las muestras a 21.920 x *g* durante 10 min, y el sobrenadante se traspasaba a un tubo COREX®, se añadía 1 volumen de alcohol isopropílico y se incubaba 20 min en hielo, tras lo cual se centrifugaba de nuevo con las mismas condiciones.

El precipitado se resuspendía en 0,5 mL de TE (Tabla 17) y se traspasaba a un microtubo de 1,5 mL, donde se añadía 150 µL acetato de sodio 3M y 0,5 mL de alcohol isopropílico. Se incubaba 20 min en hielo, y se volvía a centrifugar a 21.920 x *g* durante 10 min.

Tabla 17. Composición del tampón TE.

Tris/HCl pH 7,5	25 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Posteriormente, se añadía alcohol etílico al 70 % para lavar y eliminar restos. Tras la última centrifugación, se descartaba el sobrenadante y se dejaba secar el precipitado de ADN, tras lo cual se resuspendía en un volumen adecuado de agua.

2.2.1.2- Extracción de ADN genómico de *A. thaliana*.

Para la purificación del ADN genómico de *A. thaliana*, se seguía el método descrito a continuación (Edwards, K. y col., 1991).

Se tomaban unos 100 mg de hojas frescas y se introducían en un microtubo de 1,5 mL, congelándolas inmediatamente al adicionar N₂ líquido en el microtubo. Una vez congeladas, se procedía a su pulverización utilizando émbolos de plásticos esterilizados.

Una vez obtenido un polvo homogéneo, se añadían 400 µL de tampón de extracción precalentado a 65 °C (Tabla 18) y arena de mar estéril, y se homogeneizaba la mezcla de nuevo. Se añadían 600 µL de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se incubaban a 65 °C durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaba a 21.920 x *g* durante 10 min para eliminar los restos celulares, y se recogían los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante. Se añadía 1 volumen de alcohol isopropílico para precipitar los ácidos nucleicos y se incubaban en hielo durante 20 min, tras lo cual se centrifugaba a 21.920 x *g* durante 15 min. El precipitado se lavaba con alcohol etílico al 70 %, se dejaba secar y se resuspendía en 50 µL de agua MilliQ® estéril.

Tabla 18. Composición del tampón de extracción.

Tris/ HCl pH 8,0	220 mM
Edta-Na ₂ pH 8,0	22 mM
NaCl	800 mM
d-Sorbitol	140 mM
n-laurilsarcosina	1% (p/v)
CTAB	0,8 % (p/v)

2.2.1.3- CUANTIFICACIÓN DE ADN.

La cuantificación de muestras de ADN se llevaba a cabo utilizando un espectrofotómetro comercial Nanodrop© ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.1.4- Amplificación por PCR de fragmentos de ADN.

2.2.1.4.1- PCR convencional.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés '*Polymerase Chain Reaction*') es un método enzimático que consiste en la replicación *in vitro* de secuencias específicas de ADN, obteniéndose millones de moléculas a partir de pocas moléculas de ADN.

2.2.1.4.1.1-Cebadores de oligonucleótidos.

Los cebadores de reacción para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR convencional fueron diseñados utilizando la herramienta bioinformática Primer3 (Materiales y Métodos, apartado 2.5.1). La secuencia de los cebadores utilizados en esta Tesis Doctoral se recoge en el Anexo 2.

2.2.1.4.1.2-Condiciones de reacción.

Para amplificar fragmentos de ADN mediante PCR convencional, se utilizaba la enzima *Taq* polimerasa, procedente del kit comercial IBIAN®-*Taq* DNA polimerasa (IBIAN Technologies) y los componentes necesarios para que tenga lugar la reacción de amplificación (Tabla 19). En el caso de llevar a cabo modificaciones de los mismos, se indica en cada caso.

Tabla 19. Reactivos utilizados en la PCR para amplificar los fragmentos de interés.

ADN	10 - 500 ng
Tampón <i>Taq</i> 10 x	1 x
dNTPs-Mix 40 mM	800 μ M
Cebadores	1,25 - 5 μ M
Polimerasa <i>Taq</i>	0,25- 5 U
Agua destilada	Hasta 50 μ L
Volumen Final	50 μ L

Materiales y Métodos

El ciclo estándar de amplificación (Tabla 20) consistía en un paso inicial de desnaturalización de las dos hebras de ADN, seguido del alineamiento de los cebadores en la secuencia específica de ADN y, por último, la extensión de la cadena llevada a cabo por la enzima *Taq* polimerasa. La temperatura y tiempo de cada uno de los pasos se detalla en la Tabla 20.

Tabla 20. Condiciones del termociclador utilizadas para amplificar los fragmentos de interés.

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial:	95 °C	5'
Desnaturalización inicial:	95 °C	30''
Alineamiento:	45-65°C*	1'
Extensión:	72 °C	**
Extensión final:	72 °C	5'

x 25-30

* Temperatura variable, dependiendo de la temperatura de alineamiento de los cebadores.

** Tiempo variable, 1' por Kb de ADN a amplificar.

Cuando era necesario que el ADN producido en la amplificación no presentara mutaciones, se utilizaban polimerasas de alta fidelidad procedentes de kit comerciales, llevando a cabo las indicaciones del fabricante en cada caso. Estas polimerasas son capaces de polimerizar varias kilobases (kb) con una tasa de mutación muy baja, ya que poseen una actividad correctora de errores.

Los productos de PCR se clonaban en el vector pCR2.1-TOPO[®], utilizando el kit comercial pCR2.1-TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.1.4.2- Mutagénesis dirigida por PCR.

Las mutaciones dirigidas por PCR se han llevado a cabo mediante dos estrategias.

Una de ellas, consistía en generar mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en un ADN de interés mediante la realización de dos reacciones de PCR. La primera reacción de PCR, se llevaba a cabo con dos cebadores que contenían la mutación o la inserción. De esta forma, se producían dos secuencias flanqueantes al sitio de la mutación y portadoras de la misma. Tras purificar los fragmentos mutantes, se realizaba una reacción de PCR de unión con cebadores de los extremos exteriores de ambos fragmentos, de forma que anillaban entre sí,

permitiendo la reconstrucción del fragmento completo mutado. Se utilizaban ADN polimerasas comerciales de alta fidelidad, siguiendo las instrucciones del fabricante. En el Anexo 5 se muestra un ejemplo en el que se lleva a cabo esta técnica de mutagénesis dirigida.

Otra forma de llevar a cabo mutaciones dirigidas por PCR ha sido con la utilización del método 'Quick Change'. Este procedimiento tiene la ventaja de que una sola reacción de PCR permite introducir la mutación dentro de las dos hebras de ADN del plásmido que se desea mutar. Se basa en la utilización de dos cebadores antiparalelos y complementarios, que llevan la mutación puntal elegida, o la inserción; o en el caso de una deleción, que los cebadores se sitúan a ambos lados del sitio de deleción, de forma que dicha región no se incluya en el amplicón. Para la reacción de PCR es necesaria una ADN polimerasa de alta fidelidad, y que el plásmido de ADN molde proceda de cepas bacterianas con actividad Dam1 (como las cepas DH5 α o TOP10).

El sistema Dam1 consiste en la metilación de las adeninas (A) presentes en las secuencias GAmTC. Como la enzima de restricción *dpnI*, reconoce y digiere exclusivamente el ADN que se encuentra metilado en GAmTC, esta endonucleasa se utiliza sobre el producto de PCR, porque digerirá el ADN molde pero no eliminará el plásmido amplificado mutado, ya que éste proviene de la reacción de PCR y, por tanto, no se encuentra metilado. Por último, se procede a la transformación de *E. coli* con el producto de PCR. Para el diseño de los cebadores se utilizó la herramienta bioinformática "QuickChange Primer Design", disponible en: <https://genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>. En el Anexo 6 se muestra un ejemplo en el que se lleva a cabo esta técnica de mutagénesis dirigida.

2.2.1.5- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Todas las operaciones de electroforesis de ácidos nucleicos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones recogidas en el Manual de Laboratorio Sambrook (Sambrook, J. y Russell, D.W., 2001).

Los geles de agarosa se preparaban, según la concentración requerida, al 0,8-1 % (p/v) de agarosa en tampón TAE 1x (40 mM Tris/ Acetato, 1 mM EDTA), añadiendo 0,05 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de RedSafe™ (INtRON Biotechnology), para visualizar el ADN a la luz UV.

Materiales y Métodos

A las muestras se les añadía tampón de carga de ADN 5X y se disponían en los pocillos del gel, el cual se encontraba sumergido en el mismo tampón TAE contenido en la cubeta de electroforesis, y se aplicaba un voltaje de 80-120 V.

Las fotografías del gel se realizaron con el sistema Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare).

2.2.1.5.1- Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Para la extracción de ADN de la matriz del gel de electroforesis, se cortaba la banda de interés con un bisturí y se recuperaba el ADN contenido mediante la utilización del kit comercial 'FavorPrep GEL/PCR purification mini kit' (IBIAN Technologies) o el kit 'NucleoSpin® Extract II kit' (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

2.2.1.6- Manipulación enzimática de ADN.

2.2.1.6.1- Digestión del ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo utilizando las enzimas y los tampones, así como las condiciones recomendadas por el fabricante. Se preparaban soluciones de ADN, entre 50-100 µg/µL, 1 U de enzima por µg de ADN, el tampón correspondiente, en un volumen total de entre 25-50 µL y se incubaba a 30 min a la temperatura indicada para cada enzima. La digestión conjunta de varias enzimas se realizaba con el tampón en el que ambas presentaban las mejores actividades.

En las ocasiones en las que se necesitaba realizar una manipulación posterior, los productos de la digestión enzimática se separaban mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaba el fragmento de interés.

2.2.1.6.2- Ligamiento de fragmentos de ADN.

Los vectores y los insertos de ADN a ligar, se digerían con las endonucleasas de restricción apropiadas. El ligamiento se llevaba a cabo con la enzima T4 ligasa de ADN, 'T4 DNA Ligase' (Thermo Fischer Scientific), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

2.2.1.7- Secuenciación de ADN.

Las reacciones de secuenciación de ADN fueron realizadas, con los cebadores correspondientes en cada caso, por la empresa de secuenciación SECUGEN S.L (CIB, Madrid, España) o STABvida (Campus FCT UNL, Caparica, Portugal), siguiendo las instrucciones en cada caso.

2.2.2- Cuantificación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.

2.2.2.1- Extracción y cuantificación de ARN.

La extracción de ARN para llevar a cabo la cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real, se realizaba con el kit comercial de extracción NucleoSpin®, RNA Plant (Macherey-Nagel), partiendo de 0,1 g de material vegetal y siguiendo las instrucciones del fabricante. El material vegetal se trituraba en un mortero con una maza, ambos estériles, mediante la adición de N₂ líquido, de forma que el material vegetal fuese homogéneo.

Una vez obtenido el ARN, se trataba con la enzima ADNasa para asegurar la eliminación de ADN de las muestras. Para ello, se utilizó el kit comercial DNA-free™ (Applied Biosystems/Ambion), siguiendo las instrucciones indicadas.

La concentración y la calidad de las muestras de ARN se determinaron con el sistema Nanodrop© ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.2.2.2- Síntesis de ADNc.

La obtención del ADNc (ADN complementario) se realizaba mediante el empleo del kit comercial 'High capacity cDNA Reverse transcriptions Kit' (Applied Biosystems). Las condiciones del termociclador para la reacción de amplificación se recogen en la Tabla 21.

Tabla 21. Condiciones del termociclador para la síntesis de ADNc.

	Temperatura	Tiempo
Paso 1	25 °C	10'
Paso 2	37 °C	120'
Paso 3	85°C	5'
Paso 4	4 °C	-

2.2.2.3- Cuantificación relativa de la expresión génica.

La técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR, del inglés, '*Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction*') se basa en la detección y cuantificación de los niveles de ARNm de un gen de interés, permitiendo la estimación de sus niveles de expresión. Para ello, se utiliza un método de generación de fluorescencia que permite seguir el desarrollo de la reacción de amplificación.

La aplicación de esta técnica sobre muestras de ADNc y con cebadores que amplifiquen específicamente una secuencia de ADN del gen de interés, permite cuantificar los niveles de expresión de dicho gen en múltiples condiciones. Cuanto mayor sea la transcripción del gen, mayor será la cantidad de ARNm del mismo, y por tanto, su presencia en el ADNc.

El valor que nos permite realizar esta cuantificación es el C_T ('*Threshold Cycle*'), que se define como el ciclo de la PCR en el que la señal de fluorescencia cruza la línea umbral, indicando la detección del producto de PCR acumulado. En este punto la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo una relación lineal entre el logaritmo del cambio de fluorescencia y el número de ciclos.

Esta técnica se llevó a cabo mediante el empleo del sistema '7500 Real-Time PCR System' (Applied Biosystems), y el agente intercalante SYBR® Green como método de generación de fluorescencia.

Las reacciones de PCR se prepararon con el kit comercial KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2x) Universal (KAPABIOSYSTEMS), que contiene los componentes necesarios (ADN polimerasa, fluorescente SYBR® Green I, MgCl₂), para realizar la reacción de RT-PCR, a excepción del ADNc y los cebadores específicos. Los cebadores utilizados, recogidos en el Anexo 2, fueron diseñados utilizando el programa bioinformático Primer3 (Materiales y Métodos, apartado 2.5.1). Los componentes añadidos a cada reacción, se recogen en la Tabla 22.

Tabla 22. Componentes presentes en cada reacción de RT-qPCR.

ADNc (1 µg/ µL)	2 µL
SYBR Green Mix®*	10 µL
ROX Low (10 nM)	0,4 µL
Cebador 5' (0,2 µM)	0,4 µL
Cebador 3' (0,2 µM)	0,4 µL
Agua destilada	6,8 µL
Volumen Final	20µL

*Contiene MgCl₂ a una concentración final de 2,5 mM.

Las reacciones se llevaban a cabo en placas de 96 pocillos, PCR® Microplate (Axygen INC.), selladas con un film óptico autoadhesivo, Platemax® UltraClear Sealing Film (Axygen INC.), para evitar la evaporación durante la reacción.

En la Tabla 23, se muestran los ciclos de reacción de amplificación. Al final de cada experimento, se llevaba a cabo una fase de disociación para comprobar que se realizaba la amplificación de un único producto.

Tabla 23. Reacción de amplificación de RT-PCR.

	Temperatura	Tiempo
Activación enzimática:	95 °C	3'
Desnaturalización:	95 °C	30''
Alineamiento/extensión:	60°C*	35''

} x 40

2.2.2.3.1- Eficiencia de la reacción de PCR.

Antes de llevar a cabo una reacción de RT-qPCR con cebadores de nuevo diseño, se llevaba a cabo la validación del método para asegurarnos de la fiabilidad de los resultados obtenidos. Para ello, se realizaba la reacción de PCR con diluciones seriadas del ADNc, de forma que al representar el ciclo umbral (C_T) de cada muestra frente al logaritmo en base 10 de la dilución usada (1/2,5; 1/5; 1/25, etc) se obtenía una línea recta cuyo valor de la pendiente mostraba la eficiencia de la reacción. Un valor de pendiente de -3,33 implica una eficiencia del 100 %, por lo que cuanto más próximo a dicho valor se encuentre, mayor fiabilidad tendrá el ensayo con los cebadores utilizados.

Para calcular la eficiencia (E) de un ensayo de RT-qPCR se utiliza la siguiente fórmula:

$$E = (10^{-1/pendiente} - 1) \times 100$$

2.2.2.3.2- Análisis de cuantificación relativa: Método comparativo C_T .

El método de cuantificación utilizado fue el de cuantificación relativa, que se basa en la expresión relativa del gen de interés (gen diana) respecto a un gen control de referencia cuyos valores de expresión no cambian en ninguna condición experimental. Son genes constitutivos o *Housekeeping* (Thellin, O. y col., 1999).

Los niveles de expresión se determinaron mediante el método del C_T comparativo (Método $\Delta\Delta C_T$) (Livak, K.J. y Schmittgen, T.D., 2001), que compara el valor de C_T del gen de interés y el del gen de referencia, en las condiciones estudiadas. Para llevar a cabo este método, la eficiencia (E) de la amplificación del gen diana y del gen de referencia debe ser aproximadamente la misma.

Este método constituye uno de los más utilizados para obtener cuantificaciones rápidas de muchos genes. El valor del '*Fold Change*' (FC) muestra el incremento o disminución de la expresión del gen diana en las condiciones estudiadas (muestra de estudio) frente a las condiciones control (muestra calibrador). Para obtener el valor de FC, se llevan a cabo los cálculos descritos a continuación:

A partir de los valores de C_T proporcionados por el sistema para cada gen (gen diana y gen de referencia) y en cada una de las condiciones (muestra de estudio y muestra calibrador) se obtiene el valor ΔC_T para cada muestra, según la fórmula:

$$\Delta C_T = C_T (\text{gen diana}) - C_T (\text{gen de referencia})$$

Una vez obtenidos los valores ΔC_T para cada condición, se calcula el valor $\Delta \Delta C_T$ mediante la fórmula:

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T (\text{muestra estudio}) - \Delta C_T (\text{muestra calibrador})$$

Finalmente, el valor de FC se calcula según:

$$FC = 2^{(-\Delta \Delta CT)}$$

Un valor de FC igual a 1, indica una expresión similar del gen diana en las condiciones control y las condiciones de estudio; un valor menor de 1, indica una expresión menor del gen diana, es decir, represión del gen de interés en la condición experimental de estudio; y un valor mayor de 1, indica una expresión mayor del gen diana, es decir, inducción del gen de interés en las condiciones de estudio.

2.3- MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.

2.3.1- Purificación de membranas totales de levadura.

Para extraer las membranas totales de levadura, la cepa de interés se crecía en 100 mL de medio YPD hasta saturación. Las células se recogían mediante centrifugación a $4.697 \times g$ durante 10 min y se lavaban dos veces con agua destilada. Tras la última centrifugación, las células se resuspendían con 4,5 mL de agua y se trataban con una solución de detergentes e inhibidores de proteasas (Tabla 24), a la que se añadían bolas de vidrio (diámetro de 0,5 mm) frías y se resuspendían mediante un agitador, 5 veces durante 1 min cada una e incubando en hielo entre una y otra, con el objetivo de llevar a cabo la rotura celular y solubilización de las proteínas, impidiendo que se produjese la degradación de las mismas. Posteriormente, se añadían 10 mL de GTED 20 (Tabla 25), y tras homogeneizarlo, se centrifugaban a $4.697 \times g$ y 4°C durante 10 min. El sobrenadante se decantaba con cuidado de no coger ninguna bola de vidrio, y se centrifugaba a $32.146 \times g$ en una Ultracentrífuga con rotor S-34 (Thermo Scientific™

Materiales y Métodos

SS-34 Fixed Angle Rotor) durante 30 min. El precipitado de membranas crudas se resuspendía entonces con 200 μ L de GTED 20 (Tabla 25), se le añadía 1 μ L de PMSF 100 mM y 1 μ L de quimostatina 5 mg/ mL, y se almacenaba a -80 °C.

Tabla 24. Composición del tampón de extracción.

Tris/ HCl pH 8,0	800 mM
EDTA pH 8,0	80 mM
PMSF*	3 mM
Quimostatina**	20 mM

*Fluoruro de fenilmetilsulfonilo: inhibidor de proteasas de serina.

** '*Chymostatin*': inhibidor de numerosas proteasas (quimotripsina, catepsina, etc)

Tabla 25. Composición de GTED 20.

Tris pH 7,6	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
Glicerol	10 % (p/v)
DTT*	1 mM

*Ditiotreitol: se añadía antes de usar.

2.3.2- Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas presente en los extractos de membranas totales obtenidos se determinó mediante el método Bradford (Bradford, M.M., 1976), utilizando el reactivo de Bradford (Sigma) y albúmina de suero bovino (BSA) como proteína patrón.

Este ensayo se basa en el cambio de absorbancia a 595 nm que experimenta el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (presente en el reactivo de Bradford), al interactuar con los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Así, tras realizar una recta patrón con BSA, se calculaba la concentración de las proteínas presentes en los extractos de membranas totales. Para ello, las muestras se disponían en una placa multipocillos y la absorbancia se determinaba a 595 nm en el lector de placas BioTek® Power Wave XS2 (BioTek Instruments Inc.).

2.3.3- ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT).

2.3.3.1-Electroforesis en condiciones desnaturizantes de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La electroforesis de proteínas permite llevar a cabo la separación de éstas en base a su movilidad en un campo eléctrico. Esta técnica se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, permitiendo así separar las proteínas en base a su masa. El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas, eliminando las estructuras secundaria y terciaria (sin alterar los puentes disulfuro), y las reviste de carga negativa de forma proporcional a su masa, igualándose así las cargas de todas las proteínas, por lo que la separación tiene lugar según sus tamaños moleculares.

El rango de separación de las proteínas en el gel viene dado por el porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida. Cuanto más bajo sea el porcentaje, mejor se separan de proteínas de gran tamaño. Por tanto, el porcentaje elegido en cada caso, dependía del tipo de muestra y el peso molecular de la proteína de interés.

Para llevar a cabo la electroforesis, se siguió el método de electroforesis discontinua (Laemmli, U.K., 1970), empleando un gel de apilamiento o concentración (*'Stacking gel'*) de pH 6,8 y un 5% (p/v) de acrilamida; y un gel de resolución (*'Resolving gel'*), de pH 8,8 y un porcentaje de acrilamida variable entre el 8 y el 12 %.

La polimerización de los geles se llevó a cabo con PSA (persulfato amónico) a una concentración de 0,1 % (p/v) y TEMED como catalizador, al 0,01 % (v/v). En la Tabla 26, se muestran los componentes de los distintos geles.

Tabla 26. Componentes de los geles *'Stacking'* y *'Resolving'* para la electroforesis SDS-PAGE.

<i>Stacking gel</i>	<i>Resolving gel</i>
H ₂ O	H ₂ O
Mix acrilamida 30 %*	Mix acrilamida 30 %*
Tris pH 6,8 1M	Tris pH 8,8 1,5 M
SDS 10%	SDS 10%
PSA 10%	PSA 10%
TEMED	TEMED

*30 % acrilamida/bis solution (Bio-Rad, EEUU).

Materiales y Métodos

En los pocillos de los geles de poliacrilamida se cargaban las muestras con un total de 30 µg de proteína, que se sometían a condiciones reductoras con el fin de reducir los puentes disulfuro y conseguir una desnaturalización total. Para ello, al tampón Laemmli (Tabla 27) se le añadía el agente reductor β-mercaptoetanol, y las muestras se calentaban a 60 °C durante 10 min, antes de su carga en el gel.

Transcurrido este tiempo, las muestras se cargaban en los pocillos del gel, sumergido en el tampón de electroforesis (Tabla 28). La electroforesis vertical se llevó a cabo a una corriente constante de 25 mA por cada gel presente en la cubeta de electroforesis.

Tabla 27. Componentes del tampón Laemmli 1x.

Tris-HCl pH 6,8	375 mM
Glicerol	0,3 % (v/v)
SDS	1 % (p/v)
Azul de bromofenol	0,15 % (p/v)

Tabla 28. Componentes del tampón de electroforesis.

Tris-HCl pH 8,3	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1 % (p/v)

Para identificar las bandas de distintos pesos moleculares, así como para estimar la evolución de la electroforesis y la transferencia, se utilizaron los marcadores moleculares coloreados comerciales Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder y PageRuler™ Plus Prestained Protein, ambos de Thermo Scientific.

2.3.3.2-Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis se transferían a una membrana de PVDF (Difluoruro de Polivinilideno) (Amersham Hybond™-P, GE Healthcare), un soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo que se pueda detectar la posterior hibridación de un anticuerpo sobre ellas. Se llevó a cabo en un sistema de transferencia semi-seco (Trans-Blot® SD Semi-Dry System, Bio-Rad).

Terminada la electroforesis, el gel *Stacking* se eliminaba y el *Resolving* se incubaba en el tampón de transferencia (Tabla 29) durante 10 min. Mientras tanto, el papel de filtro especial para transferencia (*'Extra thick blot paper'*, Bio-Rad), se humedecía en el tampón de transferencia y se disponía en la base del sistema de transferencia, constituida por el ánodo (Figura 17).

Tabla 29. Composición del tampón de transferencia.

Tris-HCl pH 8,3	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20 % (v/v)

A continuación, se disponía el gel de electroforesis, y a continuación de éste, la membrana de PVDF tras sumergirla 30 segundos en metanol y 5 min en el tampón de transferencia. Por último, se disponía otro papel de filtro, tras humedecerlo en el tampón de transferencia, y la tapa (Cátodo) del sistema de transferencia, seguida de la cubierta de protección del sistema (Figura 17). La transferencia se llevaba a cabo a 150 V durante 1 h.

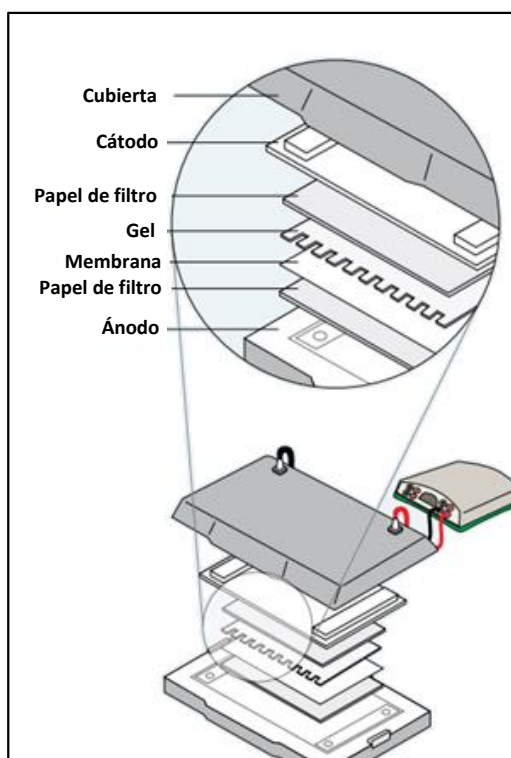


Figura 17. Detalle de la composición para llevar a cabo la transferencia de proteínas del gel de electroforesis a la membrana de PVDF, mediante la utilización de un sistema de transferencia semi-seco. Figura modificada las instrucciones proporcionadas por el Bio-Rad, del sistema 'Trans-Blot® SD Semi-Dry System'.

2.3.3.3-Inmunodetección de proteínas (INMUNOBLOT).

El primer paso para la inmunodetección de proteínas transferidas a la membrana de PVDF, consistía en el bloqueo de la membrana con leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) en tampón TBST (Tabla 30), durante 1h y a temperatura ambiente, con el objeto de reducir los lugares de unión no específicos al anticuerpo. Posteriormente, la membrana se incubaba con el anticuerpo primario a la concentración adecuada, en una disolución de leche en polvo al 5 % (p/v) en TBST, durante 14 h a 4 °C.

Tabla 30. Composición del tampón TBST.

Tris-HCl pH 7,5	200 mM
NaCl	225 mM
Tween®20	0,1 % (v/v)

A continuación, se lavaba la membrana para eliminar el exceso de anticuerpo primario, con solución de leche en polvo al 5 % (p/v) en TBST, llevando a cabo 3 lavados sucesivos de 10 min cada uno. Tras el último lavado, se incubaba la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG, conjugado con peroxidasa de rábano, a la concentración adecuada, durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizaban 3 lavados sucesivos de la membrana con leche en polvo al 5 % (p/v) en TBST.

La detección del anticuerpo se llevó a cabo utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Scientific); y la detección de la señal quimioluminiscente, mediante la utilización del sistema Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare).

En esta Tesis Doctoral el único anticuerpo primario utilizado ha sido Anti-HA, de Sigma-Aldrich; y el anticuerpo secundario fue Anti-Ig G Rabbit HRP conjugado. Ambos anticuerpos se utilizaron a una concentración de 1/5.000, concentración seleccionada tras llevar a cabo pruebas de detección con distintas concentraciones de los mismos.

2.3.4- Ensayo de fosforilación *in vitro* de proteínas.

El ensayo de fosforilación *in vitro* realizado en esta Tesis Doctoral fue llevado a cabo por el grupo del Dr. Quintero, en el centro IBVF del CSIC (Sevilla).

Las proteínas fusionadas a la Glutación S-transferasa (GST) se expresaron y purificaron de *E. coli*. Para cada reacción de fosforilación se mezclaron aproximadamente 200 ng de quinasa con la cantidad indicada de sustrato y tampón de fosforilación (Tris-HCl pH 8,5 20 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 0,1 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM), la reacción se inició con la adición de ATP 0,2 mM con 1 µCi de [γ-³²P] ATP en un volumen final de 30 µL. La mezcla de reacción se incubó durante 30' a 30 °C, tras lo cual se detuvo añadiendo 10 µL de tampón de Laemmli 4X (Tabla 27). La reacción se calentó a 95 °C durante 1', y se cargaron 10 µL de solución en un gel de SDS-PAGE. Tras la resolución del gel, se procedió a su tinción y secado, tras lo cual se expuso a una película de radiografía durante un tiempo variable, dependiendo de la reacción.

2.3.5- Ensayos de interacción *in vivo* de proteínas.

2.3.5.1- Ensayo de doble híbrido en levadura.

El sistema de doble híbrido en levadura (Y2H, del inglés '*Yeast Two-Hybrid*') es un método *in vivo* de detección de interacción de proteínas, basado en la coexpresión de dos proteínas quiméricas en *S. cerevisiae* fusionadas a las proteínas de estudio, cuya interacción reconstruye la proteína quimérica, que es un factor de transcripción (Fields, S. y Song, O.K., 1989).

El factor de transcripción GAL4 se divide en un dominio de unión al ADN, denominado BD ('*Binding Domain*'); y un dominio de activación, AD ('*Activating Domain*') y las dos proteínas de estudio, denominadas cebo y presa, se fusionan cada una a uno de los dominios de GAL4 (Figura 18A).

Si hay interacción entre las proteínas bajo estudio, se produce la reconstrucción de GAL4, que se une específicamente a la secuencia UAS ('*Upstream Activating Sequence*') del promotor de los genes seleccionables histidina (*HIS3*) y uracilo (*URA3*), activando su expresión (Figura

Materiales y Métodos

18B). La activación de la expresión de estos genes permite el crecimiento de la levadura en ausencia de estos compuestos en el medio de cultivo, lo que confirmaría que las proteínas interaccionan entre sí.

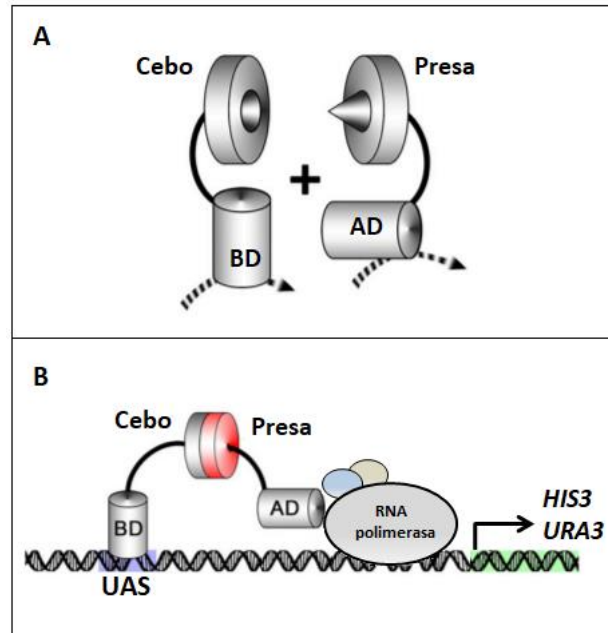


Figura 18. Ilustración del método de doble híbrido en levadura. A) Proteínas de estudio, cebo y presa, fusionadas a los dominios de GAL4, BD y AD, respectivamente. B) Representación de la activación de la expresión de los genes reporteros HIS3 y URA3, si las proteínas de estudio interaccionan entre si. BD, 'Binding Domain'; AD, 'Activating Domain'; UAS, 'Upstream Activating Sequence'. Figura modificada de Xing, S.P. y col., 2016.

Para llevar a cabo el ensayo de doble híbrido en levadura fue necesaria la utilización del kit comercial ProQuest™ Two-Hybrid System (Cat. PQ10001-01, Invitrogen).

En el Anexo 7 se detalla la generación de las construcciones para el ensayo de doble híbrido realizado en esta Tesis Doctoral.

Las construcciones se transformaban en la cepa de *S. cerevisiae* MaV203 proporcionada por el kit comercial, que reúne las características genotípicas necesarias para realizar el ensayo. El crecimiento de las células transformadas en un medio SD carente de los aminoácidos leucina, triptófano e histidina con distintas concentraciones del compuesto 3-amino-1, 2, 4-triazol (3AT), indicaría interacción entre los dominios de AtHAK5 fusionados a los dominios de la proteína GAL4. El crecimiento en medio SD en ausencia de leucina, triptófano, y uracilo indicaría que la interacción era fuerte.

Para maximizar la sensibilidad del gen reportero *HIS3*, la cepa MaV203 expresa un nivel basal de *HIS3*. El gen *HIS3* codifica una enzima implicada en la biosíntesis de la histidina, que es inhibida específicamente por el compuesto 3AT. Al añadir este compuesto al medio de crecimiento que carece de histidina, se permite la detección de la expresión de este gen incluso al darse interacciones débiles entre las proteínas de estudio.

2.3.5.2- Ensayo de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC).

La técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) permite la detección *in vivo* de interacciones entre dos proteínas, basada en la interacción entre dos mitades de una proteína fluorescente, fusionados a las dos proteínas de estudio, de forma que, si las proteínas interactúan, se reconstruye la proteína fluorescente, emitiéndose fluorescencia. Esta técnica permite la reconstrucción de la proteína fluorescente respetando su localización y expresión, de forma muy parecida a la proteína nativa (Kerppola, T.K., 2006a; Kerppola, T.K., 2006b).

La proteína fluorescente utilizada para este estudio en esta Tesis Doctoral ha sido YFP (*'Yellow Fluorescence Protein'*), cuya excitación se produce a 514 nm y su emisión a 530-550 nm. Los vectores utilizados en esta Tesis Doctoral para realizar el ensayo de BiFC se recogen en el Anexo 2. La generación de las construcciones, se detalla en el Anexo 8.

Se ha utilizado la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* para llevar a cabo la infiltración de *N. benthamiana*. Los transformantes GV3101 se co-infiltraron con la cepa p19 en hojas de *N. benthamiana* de 5 semanas, tal como se describe en el apartado 2.1.3.3.1. A los 2 y a los 3 días de la infiltración, se tomaban imágenes de cortes de hojas tratadas, mediante la utilización de un microscopio Confocal Leica SP8 utilizando el láser de argón de 514 nm y el objetivo de inmersión en aceite PL APO 63X / 1.4 AN.

2.4- ANÁLISIS BIOINFOMÁTICO.

2.4.1-Herramientas bioinformáticas.

Para acceder a la información actualizada de secuencias, se han utilizado diferentes recursos web, entre los que se encuentran: TAIR ([Http://www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), para la

Materiales y Métodos

información sobre *A. thaliana*; Sol Genomics ([Http://www.solgenomics.net](http://www.solgenomics.net)), sobre *S. lycopersicum*; NCBI ([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), UniProt ([Http://www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), y T-ADN Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

Para el manejo de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas se han utilizado las herramientas bioinformáticas presentes en el paquete DNA Star (DNASTAR, Inc. Madison), destacando la utilización de SeqBuilder y SeqMan Pro.

Se recurrió al portal ExPASy (<https://www.expasy.org/>), que proporciona herramientas y bases de datos de diferentes categorías científicas como proteómica, genómica, filogenia, biología de sistemas, etc.

La herramienta BLAST (*'Basic Local Alignment Search Tool'*), disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, se utilizaba para la búsqueda de regiones similares entre secuencias, con el objetivo de encontrar genes o proteínas homólogas entre especies o relaciones evolutivas entre secuencias, así como para identificar miembros de una misma familia de genes. Para ello, el programa compara una secuencia dada con la base de datos de que dispone, y calcula la significancia estadística de los resultados obtenidos.

Para llevar a cabo el alineamiento de múltiples secuencias, se utilizaba la herramienta CLUSTAL-Omega, disponible en el servidor online: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

Para el diseño de cebadores se utilizó el programa Primer3, teniendo en cuenta ciertas precauciones generales como evitar apareamientos intramoleculares, confirmar la ausencia de secuencias complementarias entre los extremos 3' de cada pareja de cebadores, que presentaran T_m (Temperatura de *'melting'*) similares en sí, y contenidos de C/G y A/T intermedios. Los pedidos se realizaban a la empresa Biotest Diagnosticos, S.L (Valencia, España).

2.4.2-Ensayo de RNA-seq.

Se ha llevado a cabo un ensayo de RNA-seq en plantas de tomate, cultivar Boludo, con el objetivo de identificar y analizar transcritos expresados diferencialmente en la raíz, parte aérea y fruto de plantas de tomate ayunadas de K^+ . En la Figura 19 se muestra el esquema de trabajo llevado a cabo desde el cultivo de las plantas hasta el análisis de la expresión de transcritos.

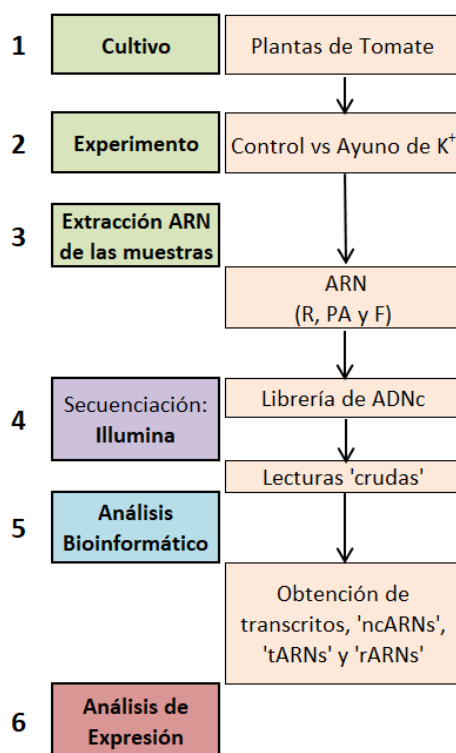


Figura 19. Esquema de trabajo del ensayo de RNA-seq. Se cultivaron plantas de tomate (1), para realizar un ensayo de RNA-seq con plantas sin ayunar (control) y ayunadas de K^+ (2). Se extrajo el ARN de raíz (R), parte aérea (PA) y fruto (F) de las muestras y se llevó a cabo la secuenciación por una empresa externa (4). Las lecturas 'crudas' obtenidas se analizaron con herramientas bioinformáticas (5) para la estimación de la expresión diferencial de transcritos en las muestras ayunadas de K^+ respecto a las no ayunadas. El análisis de los transcritos obtenidos (6) conlleva la realización de distintos abordajes.

2.4.2.1- Cultivo de las plantas.

El plan de trabajo consistió en el cultivo de tomate (*S. lycopersicum*) cultivar Boludo, en una cámara de cultivo de condiciones controladas y óptimas de luz, temperatura y humedad (fotoperiodo de 16/8h día/noche; intensidad lumínica $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, humedad del 60 % y temperatura de 25 °C). Transcurridos 10 días desde la germinación de las semillas y su siembra en vermiculita (Materiales y Métodos apartado 1.3.2.1), las plantas se transfirieron a cultivo hidropónico en contenedores de 17 litros de capacidad, que contenían solución de 1/5 de Hoagland modificada (Figura 20).



Figura 20. Cultivo hidropónico de plantas de tomate cultivar Boludo en contenedores de 17 litros con solución 1/5 de Hoagland modificada, con las condiciones de luz, temperatura y humedad controladas.

2.4.2.2- Ensayo de determinación de la absorción de K^+ en el rango de alta afinidad.

Las plantas crecieron en la solución control durante 7 días y, transcurrido este tiempo, la mitad de las plantas siguieron en solución control (plantas control) y la otra mitad se transfirieron a solución 1/5 de Hoagland modificada sin K^+ (plantas $-K$) (Figura 21).

Con el objetivo de asegurar que las raíces estaban ayunadas de K^+ , se llevó a cabo un ensayo de desaparición de K^+ del medio externo en el rango de alta afinidad (Materiales y Métodos apartado 2.1.2.2.2). Este experimento se realizó con plantas sometidas a 3, 5 y 7 días de ayuno de K^+ (Figura 21).

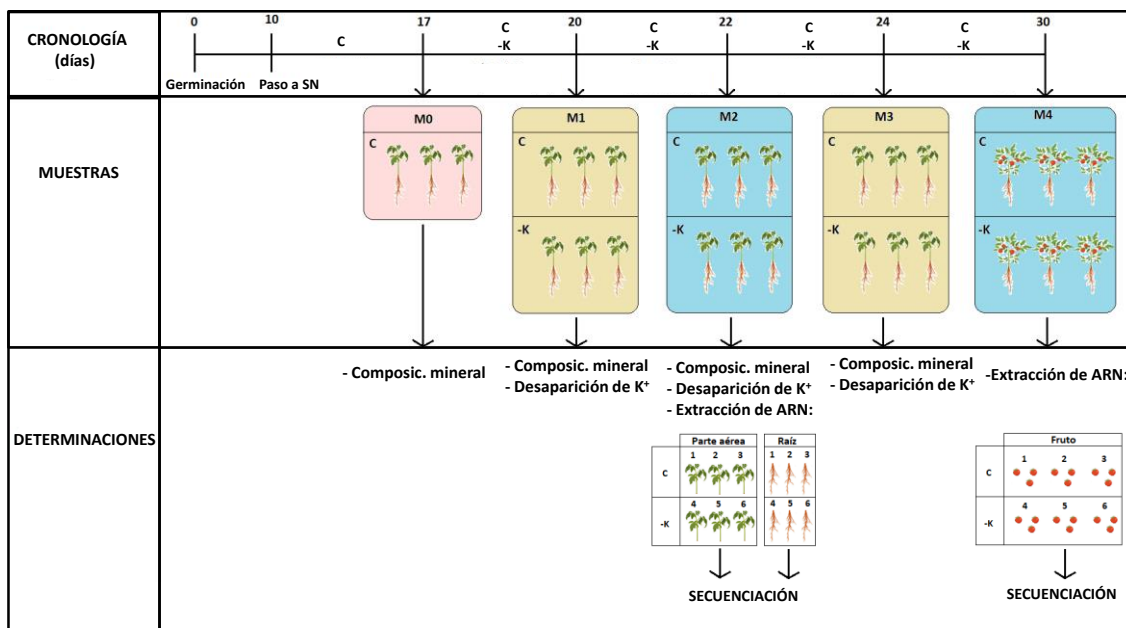


Figura 21. Cronología del cultivo de las muestras de tomate cultivar Boludo, desde la germinación de las semillas, hasta la realización de las distintas determinaciones, distintas para cada una de las muestras M0, M1, M2, M3 y M4. Se cosecharon 3 repeticiones por cada tratamiento, del 1 al 3 las plantas control, y del 4 al 6 las plantas ayunadas de K⁺. 'SN' significa 'Solución Nutritiva'. 'C', hace referencia al cultivo en solución 1/5 de Hoagland (control); y '-K', al cultivo en 1/5 de Hoagland sin K⁺.

Concluido cada ensayo, se cosecharon las muestras para llevar a cabo distintas determinaciones. Se denominaron M0 a las muestras con 17 días de edad, que fueron cosechadas antes de aplicar los tratamientos; M1 a las muestras cosechadas a los 3 días de tratamiento; M2 a las muestras con 5 días de tratamiento; M3 a las muestras con 7 días de tratamiento; y finalmente, se denominaron M4 a las muestras sometidas a 12 días de tratamiento (Figura 21).

Todas las raíces de las plantas sometidas a ayuno de K⁺, tanto a 3 días como a 5 y 7 días, mostraron absorción de K⁺ de alta afinidad asociada al transportador SIHAK5, por lo se decidió llevar a cabo extracción de ARN y posterior secuenciación para el análisis transcriptómico, de la parte aérea y raíz de las plantas sometidas a 5 días de ayuno de K⁺ (M2). Los frutos para el análisis transcriptómico se recolectaron de las muestras M4, que tenían 30 días de edad y estuvieron sometidas a un total de 12 días de tratamiento (Figura 21).

2.4.2.3- Extracción de ARN.

Tras cosechar la raíz (R), parte aérea (PA), y frutos (F) de las muestras seleccionadas, se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C. Transcurridos 5 días, se llevó a cabo la extracción de ARN de las muestras mediante el Método de TRIzol, modificado de (Chomczynski, P. y Sacchi, N., 1987), para lo cual se molieron y homogeneizaron con N₂ líquido. En el caso del fruto, se juntaron 3 frutos para formar cada réplica biológica. Todo el procedimiento se llevó a cabo con material estéril y frío.

Se partió de 0,1 g de material vegetal al que se añadió 1 mL de reactivo TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), se homogeneizó mediante agitación vigorosa, de 2 a 3 veces, durante 30 segundos cada una, y se centrifugó a 20.354 x g durante 10 minutos a 2-8 °C para eliminar el material insoluble presente en la muestra. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo, y se añadieron 200 µL de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se volvió a centrifugar a 20.354 x g durante 10 minutos a 2-8 °C, y se recogió la primera fase, correspondiente a la fase acuosa que contenía el ARN. Se añadieron 500 µL de alcohol isopropílico frío y se mezcló mediante agitación. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó a 20.354 x g durante 10 minutos a 2-8 °C, quedando el ARN precipitado. Tras eliminar el sobrenadante, se añadió 1 mL de alcohol etílico al 75 %, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 7.828 x g durante 5 minutos a 2-8 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, el ARN se resuspendió con 50 µL de tampón (Tris-HCl pH 8,0 + 1 mM de EDTA).

Una vez obtenido el ARN, se trataba con la enzima DNAasa para asegurar la eliminación de ADN de las muestras. Para ello, se utilizó el kit comercial DNA-free™ (Applied Biosystems/Ambion), siguiendo las instrucciones indicadas.

La concentración y la calidad de las muestras de ARN se determinaron con el sistema Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.4.2.4-Secuenciación Illumina.

Las muestras de ARN fueron enviadas a la empresa de secuenciación genómica BGI ('Beijing Genomics Institute'), encargada de llevar a cabo la construcción de las bibliotecas de

ADNc a partir de las muestras de ARN, y la posterior secuenciación. La secuenciación se realizó mediante la plataforma Illumina HiSeq™ 2000 (Illumina Inc.).

El resultado de la secuenciación masiva obtenido consistió en una gran cantidad de lecturas pareadas (*'paired-end'*) denominadas 'lecturas crudas', que constituyen el punto de partida para el posterior procesamiento transcriptómico. Las lecturas crudas se presentan en formato Fastq, un formato utilizado para el almacenamiento de secuencias de nucleótidos o péptidos, que además de la secuencia, contiene información sobre la calidad de la misma.

2.4.2.5- Análisis bioinformático.

El procesamiento bioinformático de las lecturas crudas obtenidas de la empresa BGI, se llevó a cabo durante una estancia de 3 meses en la Universidad de Nottingham, bajo la supervisión del Profesor Malcolm Bennett. El procesamiento bioinformático fue realizado en el Centro ADAC (*'Advanced Data Analysis Centre'*), Universidad de Nottingham, bajo la dirección del Dr. Giles.

El esquema de trabajo realizado para el análisis bioinformático de las muestras se recoge en la Figura 22.

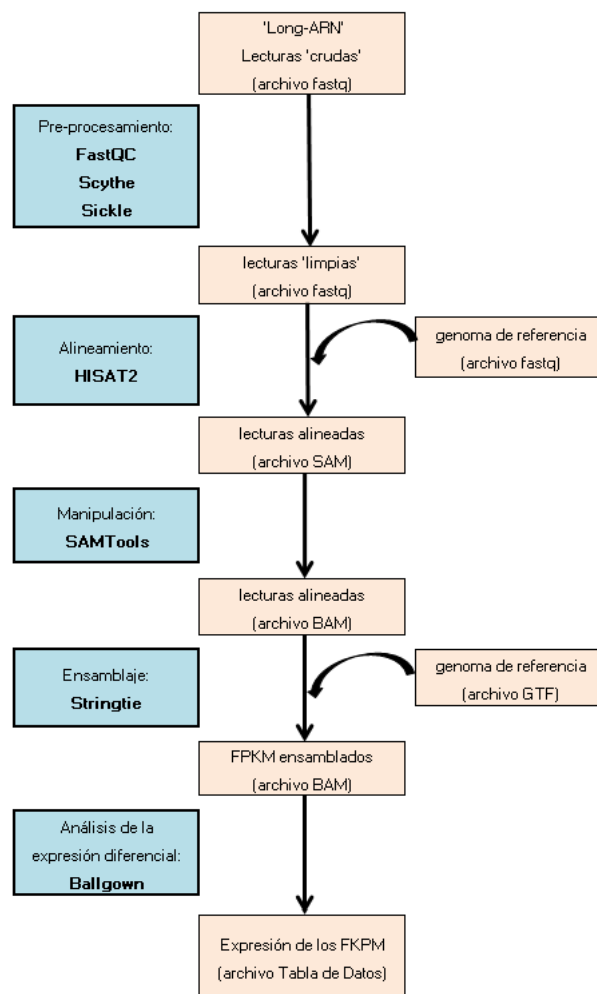


Figura 22. Diagrama de flujo de los procesos llevados a cabo tras la secuenciación. Los archivos de 'salida' de la plataforma Illumina (archivos fastq) son los archivos de 'entrada' para el alineamiento con HISAT2, previo pre-procesamiento ('limpieza') de las lecturas. Tras ser ordenadas y alineadas con la herramienta SAMTools, el archivo de 'salida' (BAM) es utilizado junto con el genoma de referencia, para el ensamblaje mediante Stringtie. Con Ballgown se obtiene la estimación de la abundancia de los FPKM ('Fragments per Kilobase per Million of reads mapped').

2.4.2.5.1-Pre-procesamiento de las lecturas:

El primer paso consistió en el análisis de la calidad de la secuenciación de las lecturas mediante la herramienta bioinformática **FastQC**, a través del servidor: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (Van Verk, M.C. y col., 2013). Esta herramienta proporciona los datos que informan sobre la calidad de cada lectura.

Posteriormente, se utilizaron las herramientas **Scythe** (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>); y **Sickle** (<https://github.com/najoshi/sickle>), que llevan a cabo una filtración de las secuencias según la calidad mínima (Quality score >28). Estos pasos

se consideran la ‘limpieza de las lecturas’. Una vez realizados, se volvió a verificar la calidad de las secuencias resultantes con **FastQC**.

2.4.2.5.2-Alineamiento con el genoma de referencia.

Para llevar a cabo el alineamiento de las lecturas con el genoma de referencia, se utilizó el programa **HISAT2** (Kim, D. y col., 2015), de software libre y disponible en <http://www.ccb.jhu.edu/software/hisat/>. HISAT2 (*‘Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts’*) se basa en el algoritmo de Burrows-Wheeler.

Antes de ejecutar el programa, se llevó a cabo ‘el indexado del genoma’, que consiste en construir el genoma a partir de archivos que contienen los sitios de ‘*splicing*’, exones y SNPs de *S. lycopersicum*.

La secuenciación mediante RNA-seq genera 5 tipos de lecturas de ARN (Figura 23): lecturas de un exón (Figura 23, a); lecturas de dos exones que abarcan muchos pares de bases (>15 pb) de cada exón (Figura 23, b); lecturas de dos exones que abarcan una longitud intermedia (de 8 a 15 pb) de uno de los exones (Figura 23,c); lecturas de dos exones que abarcan pocas pares de bases (de 1 a 7 pb) de uno de los exones (Figura 23,d); y lecturas que abarcan a más de 2 exones (Figura 23, e).

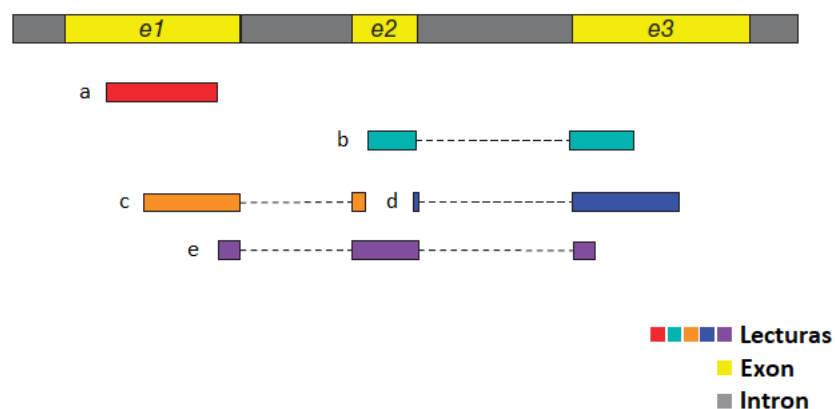


Figura 23. Tipos de lecturas generadas tras la secuenciación RNA-seq. En amarillo, los exones; en gris, los intrones; y en distintos colores, las posibles lecturas de la secuenciación: en rojo, lectura que alinea con un exón (a); en verde, lectura que alinea con dos exones, abarcando muchas pares de bases de ambos (b); en naranja, lectura que alinea con dos exones, abarcando una longitud intermedia de uno de los exones (c); en azul, lectura que alinea con dos exones, abarcando pocas pares de bases de uno de los exones; y en lila, lectura que alinea con más de dos exones. Figura adaptada de (Kim, D. y col., 2015).

2.4.2.5.3-Unión de transcritos.

Mediante el uso de **SAMtools** (Li, H. y col., 2009), las réplicas técnicas se ordenaron y unieron, obteniéndose un archivo de salida de tipo BAM (*'Binary Alignment Maps'*).

2.4.2.5.4-Ensamblaje y estimación de la abundancia.

Los transcritos fueron ensamblados en el genoma de tomate usando la herramienta **Stringtie (Pertea, M. y col., 2015)**, quedando almacenados en un archivo GTF (*'Gene Transfer Format'*). Esta herramienta también identifica la abundancia de los transcritos, basándose en el coeficiente de correlación de Spearman. El número de lecturas que se observa para cada transcrito depende de diversos factores, como la profundidad en la secuenciación, la longitud del transcrito y su nivel de expresión. Para normalizar la estimación, los valores de expresión para cada uno de estos se midieron en FPKM (en inglés, *'Fragments Per Kilobase per Million reads mapped'*) (Mortazavi, A. y col., 2008), calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$FPKM = \frac{C}{N \times L} \times 10^9$$

Donde:

C= conteo de cada isoforma.

N= conteo total de la muestra.

L= longitud del transcrito.

En la Figura 24, se ilustra la normalización por el valor FPKM, respecto al conteo de lecturas.

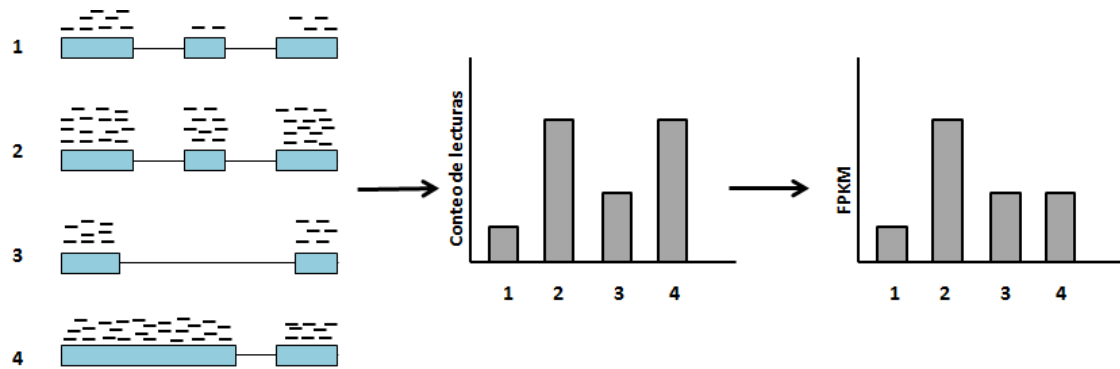


Figura 24. Ilustración de la normalización del conteo de lecturas mediante el índice FPKM. Se muestran transcritos de diferentes tamaños con distinta cobertura de lecturas (a la izquierda), el total de conteos de lecturas para cada uno (en el medio) y la normalización mediante FPKM (a la derecha). Figura modificada de Garber, M. y col., 2011.

2.4.2.5.5-Expresión diferencial.

Una vez cuantificada la expresión de los transcritos, se realizó el análisis de la expresión diferencial, que consistió en la identificación de las isoformas que presentaban un cambio en su expresión entre las condiciones experimentales estudiadas (es decir, por ayuno de K^+). La estimación de la expresión diferencial de los transcritos se llevó a cabo con la herramienta **Ballgown** (Frazee, A.C. y col., 2014), disponible en: <https://github.com/alyssafrazee/ballgown>, y la unidad de medida de expresión fue FPKM. Los valores de expresión se presentaron como Log_2 de 'Fold Change', calculado en base al número de FPKM para cada condición estudiada.

2.4.2.6- Análisis de los transcritos.

Con el fin de obtener información sobre los transcritos expresados diferencialmente, se utilizó la herramienta bioinformática PLAZA (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>), un servidor online que centraliza los datos genómicos producidos por diferentes iniciativas de secuenciación de genomas, e integra los datos de secuencias de plantas y métodos genómicos comparativos, proporcionando una plataforma en línea para realizar análisis evolutivos y minería de datos.

Materiales y Métodos

Para analizar un conjunto de genes dados, PLAZA ofrece numerosos archivos asociados a estos genes, como las secuencias nucleotídicas y proteicas, la obtención de los términos GO ('GO terms'), el cálculo de los términos GO sobre-representados e infra-representados ('GO enrichment'), y la identificación de genes ortólogos en la especie *A. thaliana*.

2.5- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los análisis estadísticos se realizaban con el programa SPSS Statistics v.25 para Windows (IBM Corporation). La comparación entre valores medios se realizó mediante el Test de Tukey utilizando un p-valor menor de 0,05, como probabilidad de corte indicativa de diferencias significativas y de acuerdo con el diseño experimental de cada ensayo.

IV. Resultados y Discusión

CAPÍTULO 1:

**INFLUENCIA DEL SUMINISTRO DE NO_3^- PO_4^{3-} Y
 SO_4^{2-} EN LA HOMEOSTASIS DE K^+ .**

Numerosos estudios indican que las vías de señalización de las respuestas de las plantas a la disponibilidad de los distintos nutrientes están interconectadas (Hammond, J.P. y White, P.J., 2008; Amtmann, A. y Blatt, M.R., 2009; Wang, Y. y Wu, W.-H., 2013). Estas conexiones han sido estudiadas a diferentes niveles (Wang, Y.-H. y col., 2002; Schachtman, D.P. y Shin, R., 2007; Shin, R., 2011; Tsay, Y.-F. y col., 2011) y se considera que existe una respuesta general a la deficiencia de nutrientes.

La tasa de absorción de un nutriente a menudo es determinada por la tasa de crecimiento de la planta, la cual depende del estado nutricional general de la misma (Walker, R.L. y col., 2001). Por tanto, la ausencia de un nutriente determinado puede llevar a la disminución de la absorción de otros nutrientes.

1- CARACTERIZACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE K⁺ DE BAJA AFINIDAD Y TRANSLOCACIÓN DE K⁺ EN CONDICIONES DE DEFICIENCIAS NUTRICIONALES.

Las células de las raíces de las plantas perciben la concentración externa de K⁺ y emplean el mecanismo de absorción de K⁺ apropiado para captarlo según la concentración externa del mismo. Como ya se ha comentado en el apartado de **Introducción**, los estudios llevados a cabo en *Arabidopsis* han mostrado que la absorción de K⁺ de baja afinidad está mediada fundamentalmente por el canal de K⁺ AKT1, siendo éste el sistema de absorción más relevante a concentraciones externas de K⁺ superiores a 0,5 mM. La circulación de K⁺ desde la raíz a la parte aérea se lleva a cabo a través del xilema (Poirier, Y. y col., 1991; Engels, C. y Marschner, H., 1992; Park, J. y col., 2008) y en este transporte, el canal rectificador de salida dependiente de voltaje denominado SKOR es una pieza fundamental (Gaymard, F. y col., 1998).

En este apartado, se describe un ensayo realizado tanto en la planta modelo *Arabidopsis* (*A. thaliana*) como en una especie importante a nivel agroalimentario como es el tomate (*S. lycopersicum*), en el que se estudia cómo afecta la falta de NO₃⁻, PO₄³⁻ y SO₄²⁻ a la absorción de K⁺ de baja afinidad y en su translocación a la parte aérea.

1.1-EFECTO DEL AYUNO DE NO₃⁻, DE PO₄³⁻ O DE SO₄²⁻ SOBRE LA ABSORCIÓN DE K⁺ DE BAJA AFINIDAD EN PLANTAS DE ARABIDOPSIS.

El ensayo en Arabidopsis se llevó a cabo con el ecotipo Columbia (Col-0). Se utilizó la línea silvestre y los mutantes nulos en los sistemas de absorción y translocación de K⁺, AKT1 y SKOR. Se ha descrito que la falta del canal AKT1 puede verse compensada por la sobreexpresión del sistema de entrada de K⁺ de alta afinidad AtHAK5 (Rubio, F. y col., 2010). Por ello, para evitar la posible interferencia de AtHAK5 en estos estudios, en lugar de utilizar el mutante simple *akt1-2*, se utilizó el doble mutante *hak5-3 akt1-2*.

Las semillas de las plantas fueron esterilizadas y germinadas en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (MyM), apartado 1.3.1.1.1. Tras su cultivo durante 30 días en solución 1/5 de Hoagland modificada (MyM, apartado 1.3.1.1.2), las plantas se sometieron a los distintos tratamientos de deficiencias de nutrientes (que denominamos -K, -N, -P y -S) durante 7 días (Tabla 31).

Tabla 31. Concentraciones de K⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻ y SO₄²⁻ en las soluciones utilizadas para los distintos tratamientos. *El NO₃⁻ se añadió en forma de Ca (NO₃)₂·4H₂O; para formular la disolución -N, este compuesto fue sustituido por CaCl₂·2H₂O. El PO₄³⁻ fue añadido como Ca (H₂PO₄)₂·H₂O; para formular la disolución -P, este compuesto fue sustituido por CaCl₂·2H₂O. El SO₄²⁻ fue añadido como MgSO₄·7H₂O; para formular la solución -S, este compuesto fue sustituido por MgCl₂·6H₂O.

Tratamiento*	K⁺ (mM)	NO₃⁻ (mM)	PO₄³⁻ (mM)	SO₄²⁻ (mM)
Control	0,5	2,8	0,2	0,35
-K	0	2,8	0,2	0,35
-N	0,5	0	0,2	0,35
-P	0,5	2,8	0	0,35
-S	0,5	2,8	0,2	0

1.1.1- Efecto sobre la capacidad de absorción de K⁺.

Para caracterizar la capacidad de absorción de las raíces de las plantas sometidas a los distintos tratamientos, las plantas se transfirieron a contenedores con solución 1/5 Hoagland modificada sin K⁺, suplementada con 1,4 mM de RbCl (MyM, apartado 2.1.2.1.1).

La tasa de absorción de Rb^+ se calculó como el Rb^+ total acumulado en la planta por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Como se puede observar en la Figura 25, la tasa de absorción de Rb^+ fue mayor en la línea silvestre que en el doble mutante *athak5-3 akt1-2* en todos los tratamientos estudiados; y en ambas líneas, la deficiencia de NO_3^- , PO_4^{3-} o SO_4^{2-} produjo a una menor tasa de absorción de Rb^+ respecto al tratamiento control. Esto significa que la absorción de K^+ a una concentración externa correspondiente al rango del sistema de entrada de baja afinidad (1,4 mM) se reduce cuando hay deficiencia tanto de NO_3^- , como de PO_4^{3-} o SO_4^{2-} .

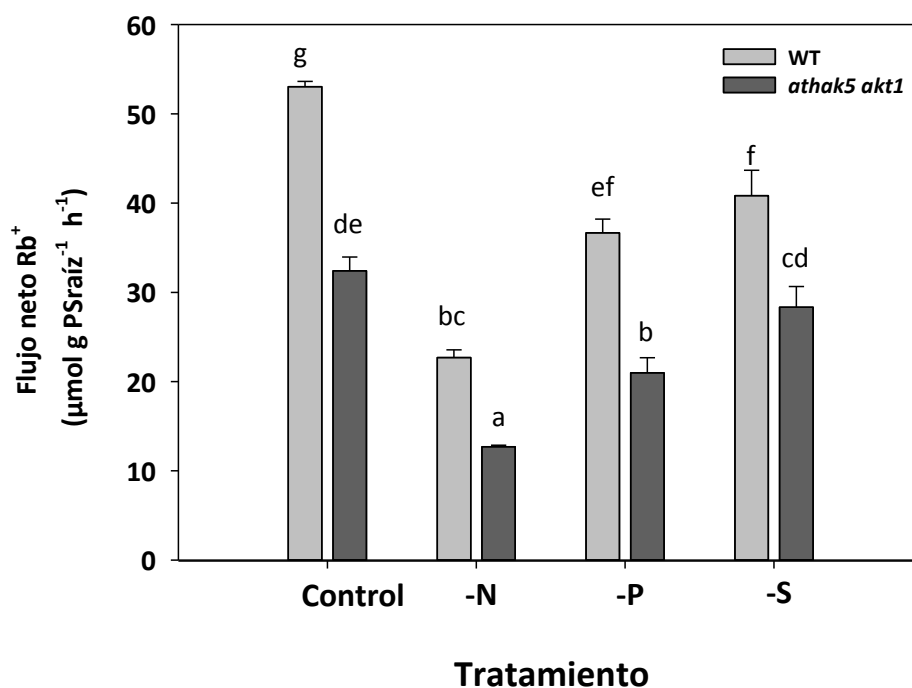


Figura 25. Tasa de absorción de Rb^+ por raíces de *Arabidopsis* WT (barras gris claro) y *athak5 akt1-2* (barras gris oscuro) tras ser sometidas durante 7 horas a 1.4 mM de RbCl y expuestas a diferentes deficiencias nutricionales durante 7 días. Los valores del flujo de Rb^+ se calcularon como la variación en la concentración interna de Rb^+ por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Se muestra la media de 6 repeticiones y las barras con diferentes letras muestran valores significativamente diferentes a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

1.1.2- Efecto sobre la translocación de K⁺.

La tasa de translocación de Rb⁺ se calculó como el contenido total de Rb⁺ acumulado en la parte aérea por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo (Figura 26). De igual forma que la absorción de Rb⁺, la translocación de Rb⁺ se ve afectada tanto en la línea WT como en la *athak5-3 akt1-2* por la deficiencia de estos nutrientes, excepto en ausencia de SO₄²⁻, donde la línea *athak5-3 akt1-2* no presentó diferencias significativas respecto al tratamiento control.

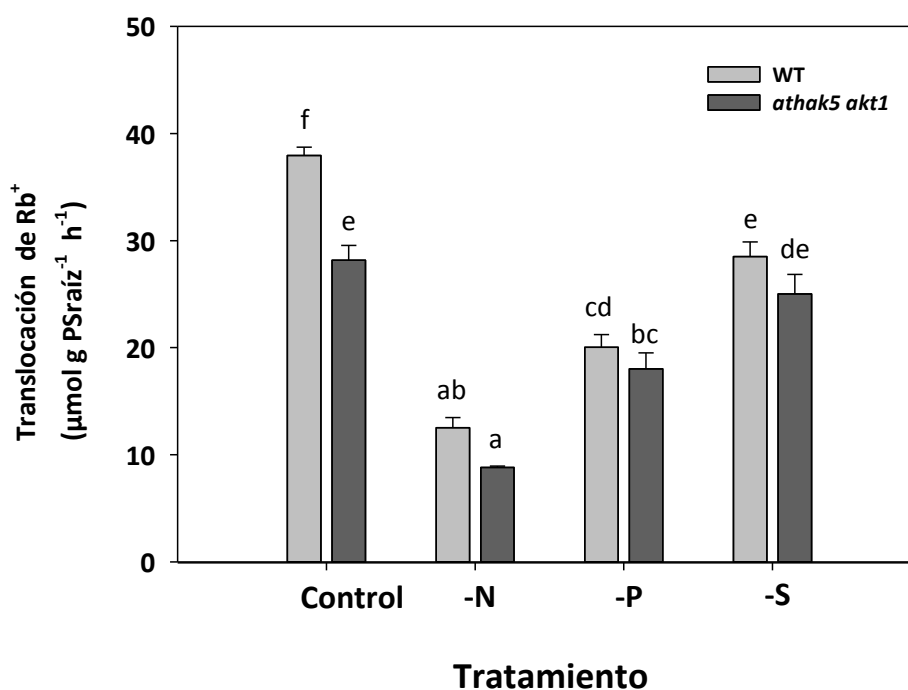


Figura 26. Tasa de translocación de Rb⁺ a la parte aérea de plantas de *Arabidopsis* WT (barras gris claro) y *athak5 akt1-2* (barras gris oscuro) tras ser sometidas durante 7 horas a 1.4 mM de RbCl y expuestas a diferentes deficiencias nutricionales durante 7 días. La tasa neta de translocación fue calculada como el incremento total de Rb⁺ en la parte aérea por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Se muestra la media de 6 repeticiones y las barras con diferentes letras muestran valores significativamente diferentes a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

Para profundizar en el estudio de los mecanismos de translocación de K⁺ que pueden verse afectados por la deficiencia de nutrientes, se repitió el ensayo utilizando el mutante *skor-1* (Gaymard, F. y col., 1998). Como se observa en la Figura 27, la tasa de translocación que

presentó este mutante también disminuyó tras someter a las plantas a las distintas deficiencias de nutrientes.

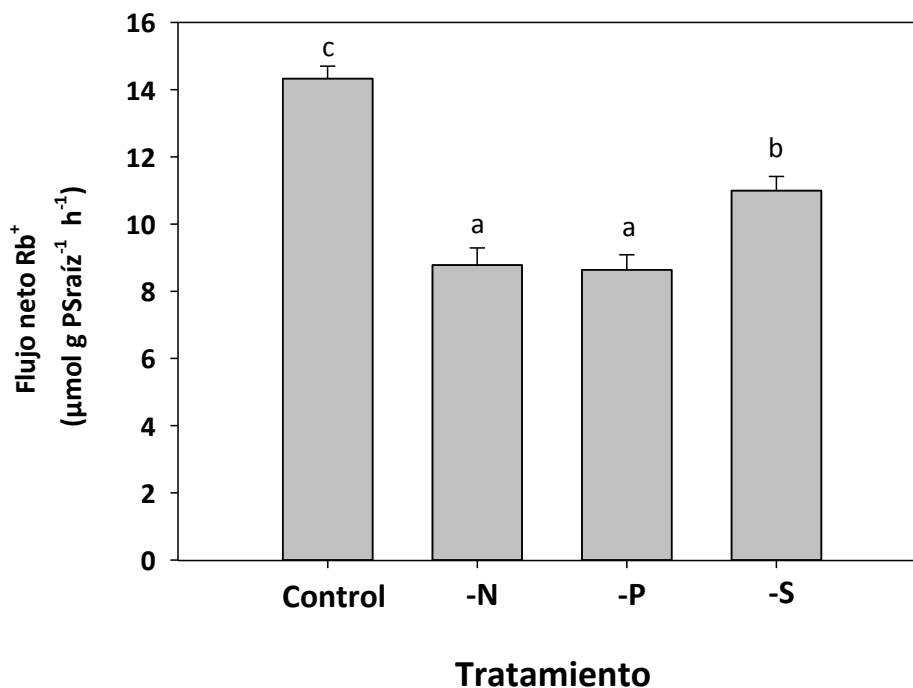


Figura 27. Tasa de translocación de Rb⁺ a la parte aérea de plantas de la línea mutante *skor-1* de *Arabidopsis*, tras ser sometidas durante 7 horas a 1.4 mM de RbCl y expuestas a diferentes deficiencias nutricionales durante 7 días. La tasa neta de translocación fue calculada como el incremento total de Rb⁺ en la parte aérea por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Se muestra la media de 6 repeticiones y las barras con diferentes letras muestran valores significativamente diferentes a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

1.1.3- Efecto sobre el crecimiento.

Los pesos secos de la parte aérea y la raíz de las plantas utilizadas en los experimentos de absorción y translocación se representan en la Tabla 32. Se observa como el tratamiento -N afectó significativamente el peso seco de tal forma que dio lugar a un aumento del peso seco de la raíz y una disminución de la parte aérea (Figura 28). También se observa que la línea *athak5 akt1-2* mostró un peso seco de la raíz significativamente mayor que el de la línea WT. Por otra parte, no se observa interacción entre los tratamientos y el genotipo.

Tabla 32. Peso seco (PS) de raíz y parte aérea (mg) de las dos líneas de *Arabidopsis* sujetas a los distintos tratamientos. Se representa la media de 6 repeticiones y el error estándar. Los valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente distintos a $P=0,05$, según el Test de Tukey. NS indica 'No Significativo'.

Genotipo	Tratamiento	PS (mg)	
		Raíz	Parte aérea
WT	Control	4,60 ± 0,38	34,13 ± 2,45
	-N	6,38 ± 0,59	24,3 ± 0,47
	-P	5,98 ± 0,28	32,88 ± 0,97
	-S	3,68 ± 0,56	29,00 ± 1,68
<i>athak5-3 akt1-2</i>	Control	5,50 ± 0,01	33,90 ± 2,12
	-N	8,02 ± 0,39	23,48 ± 0,86
	-P	5,85 ± 0,76	28,95 ± 0,29
	-S	5,38 ± 0,70	30,88 ± 1,52
Interacción:			
Tratamiento	Control	5,05 ^a	34,01 ^b
	-N	7,20 ^b	23,89 ^a
	-P	5,92 ^{ab}	30,92 ^b
	-S	4,53 ^a	29,94 ^b
Genotipo	WT	5,16	30,01
	<i>athak5-3 akt1-2</i>	6,19	29,30
Análisis de Varianza (Valor -F)			
Tratamiento (T)		10,34 ^{***}	16,46 ^{***}
Genotipo (G)		8,07 ^{**}	0,55 ^{ns}
T x G		1,371 ^{ns}	1,31 ^{ns}

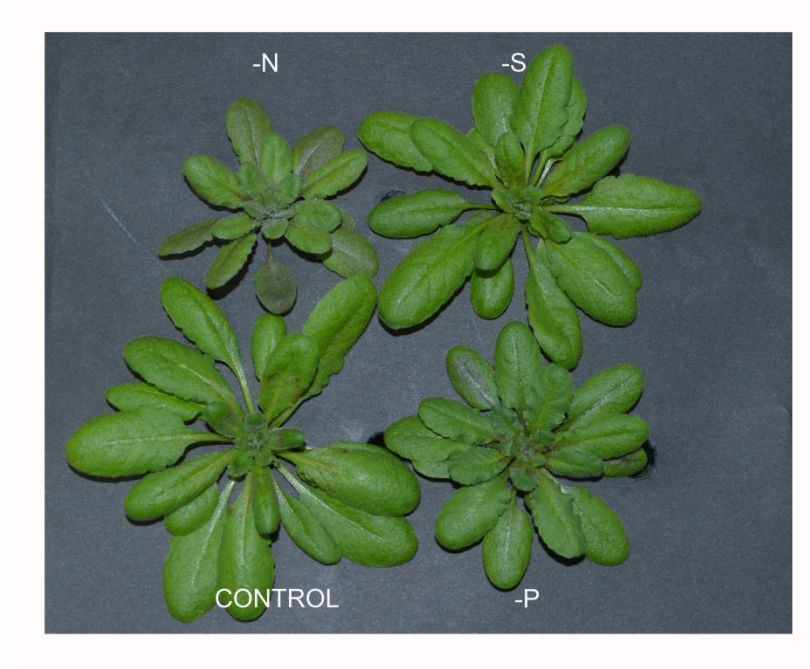


Figura 28. Se muestran las partes aéreas de plantas de *Arabidopsis* tras 7 días en los distintos tratamientos.

1.1.4- Efecto sobre la concentración de K^+ .

Se determinaron las concentraciones de los minerales presentes en los tejidos (MyM, apartado 2.1.2.1.1.1). En cuanto a las concentraciones de K^+ (Tabla 33), en la línea WT la concentración de K^+ fue significativamente mayor que en el doble mutante *athak5-3 akt1-2*, tanto en parte aérea como en raíz. La falta de NO_3^- llevó a una disminución de la concentración de K^+ en la raíz mientras que aumentó en la parte aérea. La deficiencia de SO_4^{2-} produjo una disminución significativa de la concentración de K^+ en la parte aérea. El tratamiento -P no produjo variaciones en la concentración de K^+ respecto a las plantas cultivadas en solución control. No se observó interacción entre los tratamientos y el genotipo.

Tabla 33. Concentraciones de K⁺ (mg·gPS⁻¹) en raíz y parte aérea de las dos líneas de Arabidopsis sujetas a los distintos tratamientos. Se representa la media de 6 repeticiones y el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas al 95 % ($P < 0,05$) según el Test de Tukey. El análisis de la varianza se ha llevado a cabo sobre un diseño factorial. ‘*’, ‘**’ y ‘***’ indican efecto significativo a $P < 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente. ‘ns’ indica que no hay efecto significativo al 5 %.

Genotipo	Tratamiento	[K ⁺] (mg gPS ⁻¹)	
		Raíz	Parte aérea
WT	Control	62,93 ± 2,11	42,25 ± 0,87
	-N	51,58 ± 2,21	44,23 ± 1,01
	-P	64,48 ± 4,14	40,94 ± 1,94
	-S	70,09 ± 3,78	36,29 ± 0,89
<i>athak5-3 akt1-2</i>	Control	53,08 ± 1,85	31,83 ± 1,22
	-N	45,35 ± 1,36	39,37 ± 0,79
	-P	52,25 ± 4,45	32,65 ± 0,47
	-S	59,36 ± 0,34	25,96 ± 0,90
Interacción:			
Tratamiento	Control	58,09 ^b	37,04 ^b
	-N	48,47 ^a	41,80 ^c
	-P	58,37 ^b	36,79 ^b
	-S	64,72 ^b	31,12 ^a
Genotipo	WT	62,27	40,93
	<i>athak5-3 akt1-2</i>	52,51	32,45
Análisis de Varianza (Valor F)			
Tratamiento (T)		10,03 ^{***}	32,24 ^{***}
Genotipo (G)		21,98 ^{***}	121,32 ^{***}
T x G		0,40 ^{ns}	2,86 ^{ns}

1.1.5- Efecto sobre la transcripción de los genes *AKT1* y *AtSKOR*.

Algunos estudios muestran que la ausencia de un nutriente conlleva cambios en la transcripción de genes implicados en el transporte de otros nutrientes (Maathuis, F.J.M. y col., 2003; Wang, Y.-H. y col., 2002; Nikiforova, V. y col., 2003). Por ello, se estudió el efecto de las deficiencias nutricionales aplicadas sobre la expresión de los genes *AKT1* y *SKOR*, que codifican los principales sistemas de entrada y translocación de K⁺ en las condiciones bajo estudio.

Se procedió a la extracción de ARN y síntesis de ADNc (MyM, apartados 2.2.2.1 y 2.2.2.2), para así cuantificar los niveles de ARN mensajero de los genes *AKT1* y *SKOR* mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) (MyM apartado 2.2.2.3). En este estudio se añadieron plantas ayunadas de K⁺, que sirvieron como control del comportamiento de estos genes. Como gen de

referencia, se utilizó el gen de la actina *AtACT2*, cuya secuencia se recoge en el Anexo 2. Los datos de expresión se formularon en base al método comparativo de C_T (MyM, apartado 2.2.2.3.2). Las plantas WT tratadas en la solución nutritiva completa (control) se utilizaron como muestra calibrador para el resto de niveles de expresión obtenidos en los tratamientos de estudio.

En la Figura 29 se observa la respuesta transcripcional de *AKT1* (solamente en la línea WT) y de *AtSKOR* (en WT y *athak5-3 akt1-2*) ante la falta de K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . Se observó una represión del gen *AKT1* en la planta silvestre bajo todas las deficiencias nutricionales, excepto en ausencia de K^+ (Figura 29A). Esta falta de respuesta de *AKT1* al ayuno de K^+ observada en esta Tesis Doctoral está de acuerdo con resultados previos (Pilot, G. y col., 2003a; Lagarde, D. y col., 1996). En cuanto a la respuesta del gen *AtSKOR*, su expresión fue menor en todos los tratamientos comparados con el control, tanto en WT como en el doble mutante *athak5-3 akt1-2* (Figura 29B).

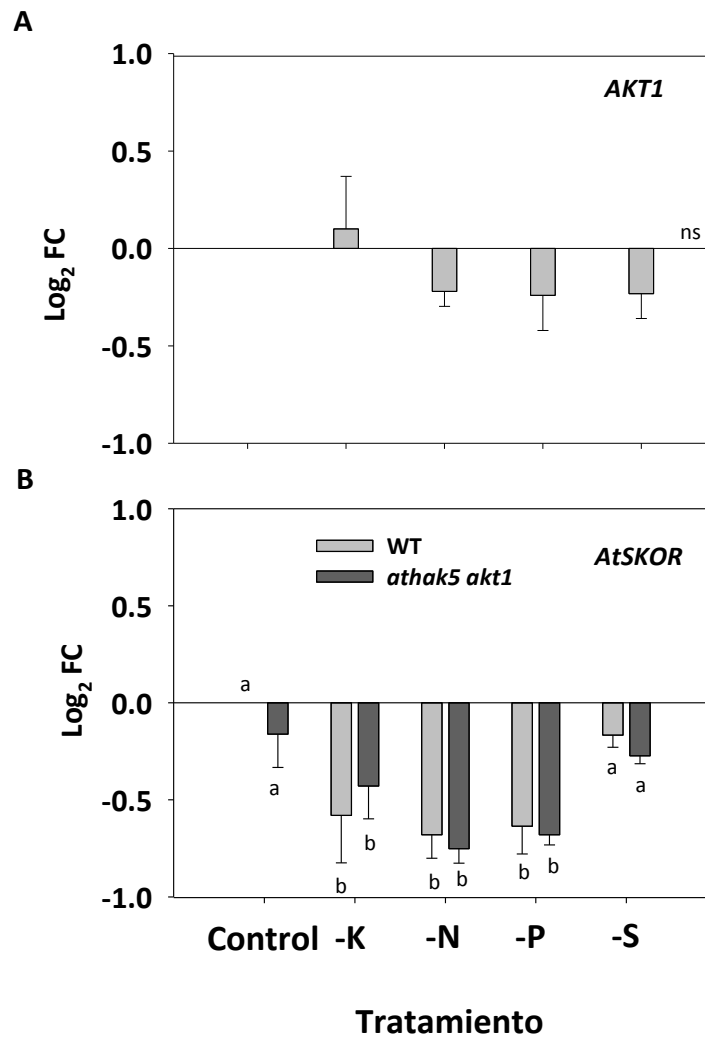


Figura 29. Niveles de expresión de *AKT1* y *AtSKOR* en respuesta a las distintas deficiencias nutricionales. Mediante PCR en tiempo real se determinaron los valores de expresión relativa del gen *AKT1* (A) y *AtSKOR* (B) en las plantas de WT (barras gris claro) y *hak5-3 akt1-2* (barras gris oscuro) tras el tratamiento en las distintas deficiencias nutricionales, respecto a las plantas control (cultivadas en solución nutritiva completa). Los niveles de expresión se muestran como el Log₂ de *Fold Change* en los genes estudiados respecto al gen *AtACT2* (control de referencia), y respecto a la muestra calibrador (muestra WT cultivada en solución control) según el método comparativo del C_T. Se representa la media de tres repeticiones. Las barras con diferentes letras muestran diferencias significativas a $P < 0,05$ según el Test de Tukey. 'ns' indica valor 'no significativo'

1.2- EFECTO DEL AYUNO DE NO_3^- , PO_4^{3-} O SO_4^{2-} SOBRE LA ABSORCIÓN DE K^+ DE BAJA AFINIDAD EN PLANTAS DE TOMATE.

Para llevar a cabo este estudio en tomate se utilizó el cultivar Micro-Tom. Las semillas de las plantas fueron esterilizadas y germinadas en las condiciones descritas en MyM, apartado 1.3.2.1.1. Tras su cultivo durante 15 días en solución 1/5 de Hoagland modificada las plantas se sometieron a los distintos tratamientos durante 7 días (Tabla 34).

Tabla 34. Concentraciones de K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} en las soluciones utilizadas para los distintos tratamientos. *El NO_3^- se añadió en forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ que para formular la disolución -N fue sustituido por $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El PO_4^{3-} fue añadido como $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ que para formular la disolución -P fue sustituido por $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El SO_4^{2-} fue añadido como $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que para formular la solución -S fue sustituido por $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Tratamiento *	K^+ (mM)	NO_3^- (mM)	PO_4^{3-} (mM)	SO_4^{2-} (mM)
Control	1,4	2,8	0,2	0,35
-K	0	2,8	0,2	0,35
-N	1,4	0	0,2	0,35
-P	1,4	2,8	0	0,35
-S	1,4	2,8	0,2	0

1.2.1- Efecto sobre la absorción de K^+ .

Para caracterizar la capacidad de absorción de K^+ de las raíces de las plantas sometidas a los distintos tratamientos, se llevó a cabo un ensayo de desaparición de K^+ del medio externo, en condiciones de baja afinidad (MyM, apartado 2.1.2.2.1).

Se tomaron muestras de la solución externa cada 3 h durante 9 h y mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) se determinó la concentración de K^+ en cada muestra. La tasa de absorción de K^+ se calculó a partir de la desaparición del K^+ en la solución externa. En la Figura 30 se representa un ejemplo de las curvas de desaparición de K^+ de la solución externa en función del tiempo.

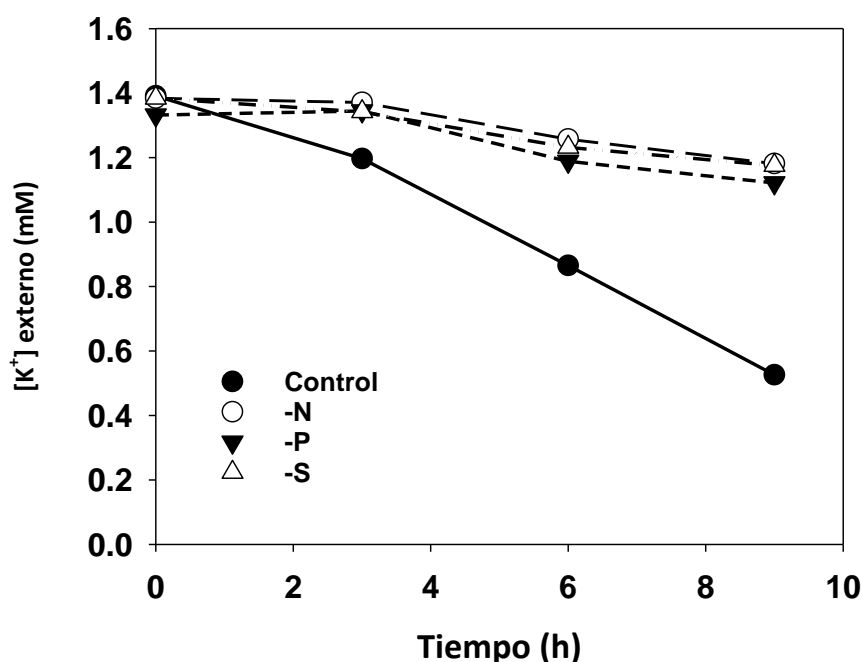


Figura 30. Curvas de desaparición de K^+ de una solución externa con raíces de plantas de tomate ayunadas de NO_3^- , PO_4^{3-} o SO_4^{2-} . Las plantas crecidas en solución nutritiva completa (control) se ayunaron de NO_3^- (círculos blancos), PO_4^{3-} (triángulos negros) y SO_4^{2-} (triángulos blancos) o siguieron en la solución control (círculos negros) durante 7 días. Posteriormente se transfirieron a una solución nutritiva completa con 1,4 mM de K^+ de la que se tomaron muestras a distintos tiempos para medir la concentración de K^+ . Se representan las concentraciones de K^+ de la solución externa a las raíces frente al tiempo.

El flujo neto de absorción de K^+ se calculó como la variación de K^+ en la solución externa por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo (Figura 31A). Observamos que la mayor capacidad de absorción de K^+ la presentan las plantas sometidas al tratamiento control mientras que la falta de cualquiera de los nutrientes estudiados produce una disminución de la absorción de K^+ del 51 %, del 47 % y del 67 % en los tratamientos -N, -P y -S, respectivamente.

A diferencia de *Arabidopsis*, en tomate no existen líneas mutantes nulas en el gen *LKT1*, homólogo a *AKT1*, y muy posiblemente responsable mayoritario de la entrada de K^+ de baja afinidad en las plantas de dicha especie. Por ello, para profundizar en la caracterización de los sistemas que median la absorción de K^+ en plantas de tomate en las condiciones utilizadas en este ensayo, se determinó la absorción de K^+ en presencia de 1 mM de Cs^+ , inhibidor del canal *AKT1* (Ammann, A. y Sanders, D., 1999) y también *LKT1* (Hartje, S. y col., 2000).

La tasa de absorción de K^+ se calculó como el porcentaje de absorción en ausencia de Cs^+ (Figura 31B) y los resultados mostraron que la presencia de Cs^+ reducía a niveles similares la tasa de absorción de K^+ en todas las condiciones estudiadas, siendo esta reducción del 44 % para plantas control, del 50 % para el tratamiento -N, del 60 % para el -P y del 68 % para el -S.

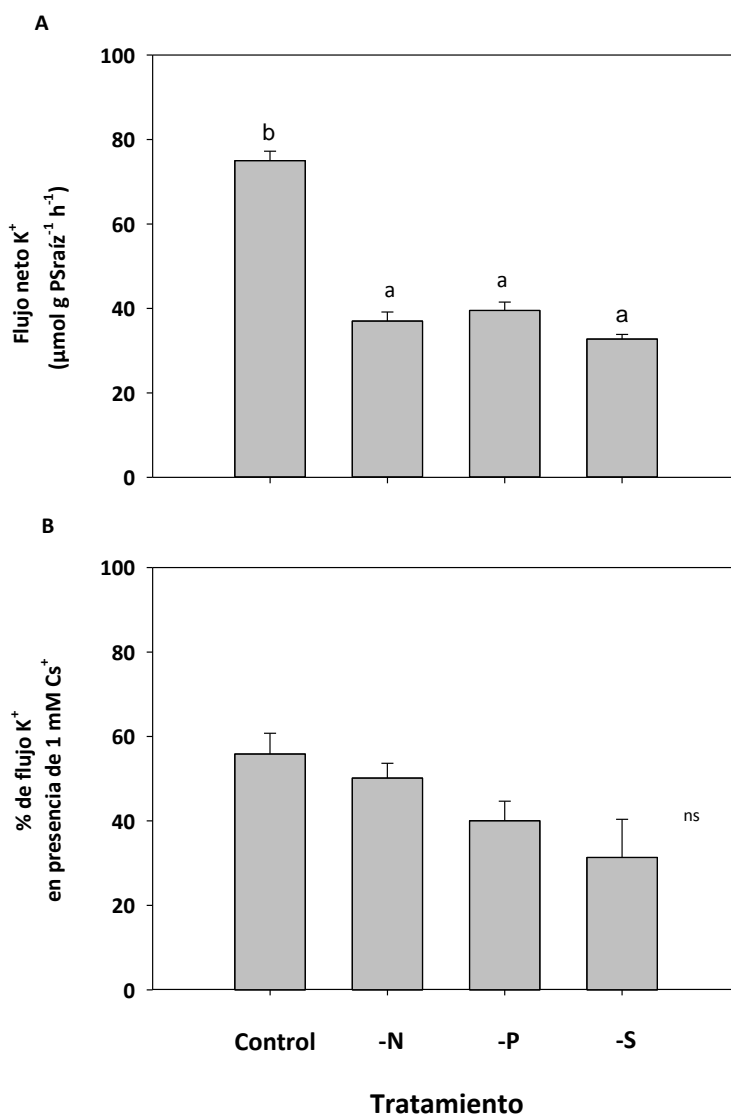


Figura 31. Tasa de flujo de K^+ en las plantas de tomate expuestas en las diferentes deficiencias nutricionales y efecto de la presencia de Cs^+ . (A) La tasa de flujo neto de K^+ por las raíces sometidas a los distintos tratamientos se calculó como la variación de la concentración externa de K^+ por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. (B) El experimento de desaparición de K^+ se repitió con plantas en solución externa con 1,4 mM de K^+ y presencia de 1 mM de Cs^+ . El flujo de K^+ en presencia de Cs^+ se calculó como el porcentaje respecto al flujo en ausencia de Cs^+ . Se muestran los valores medios de 6 repeticiones y las barras con diferentes letras son significativamente diferentes al $P < 0,05$ según el Test de Tukey. 'ns' indica 'no significativo'.

En los experimentos de desaparición de K^+ a una concentración externa de 1,4 mM K^+ no se puede descartar que el influjo de K^+ vaya acompañado de un eflujo del mismo desde el interior celular. Era posible, por lo tanto, que los efectos de las deficiencias nutricionales observados fueran debidos a variaciones del eflujo y no del influjo. Para investigar esta posibilidad, se llevó a cabo un ensayo similar utilizando Rb^+ como análogo de K^+ . En este caso no existiría eflujo, al no haber Rb^+ en el interior de las células de la raíz. Al igual que ocurría con el K^+ , se observó una reducción de la absorción de Rb^+ en las condiciones de deficiencias nutricionales (Figura 32), indicando que es el influjo de K^+ el que se ve afectado.

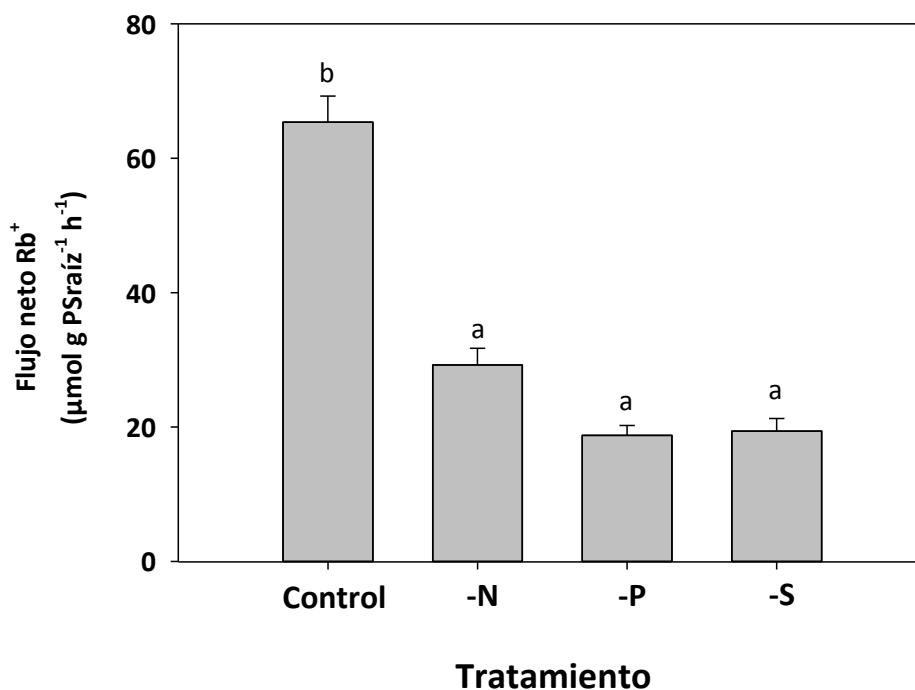


Figura 32. Tasa de flujo de Rb^+ en las plantas de tomate expuestas en las diferentes deficiencias nutricionales. El flujo de Rb^+ de las raíces de las plantas sometidas a los distintos tratamientos se calculó como la variación de la concentración externa de Rb^+ por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Se muestran los valores medios de 6 repeticiones y las barras con diferentes letras son significativamente diferentes al $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

Para apoyar estos resultados y profundizar en la caracterización de la absorción de K^+ , se llevó a cabo un ensayo basado en el análisis mineral de los tejidos como se indica en el apartado 2.1.2.2.1.1 de MyM, donde la absorción de K^+ se calculó en base a los contenidos internos de K^+ en las plantas de tomate.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 33, donde se observó que la falta de cada uno de los nutrientes reduce la acumulación de K^+ por las raíces de las plantas de tomate.

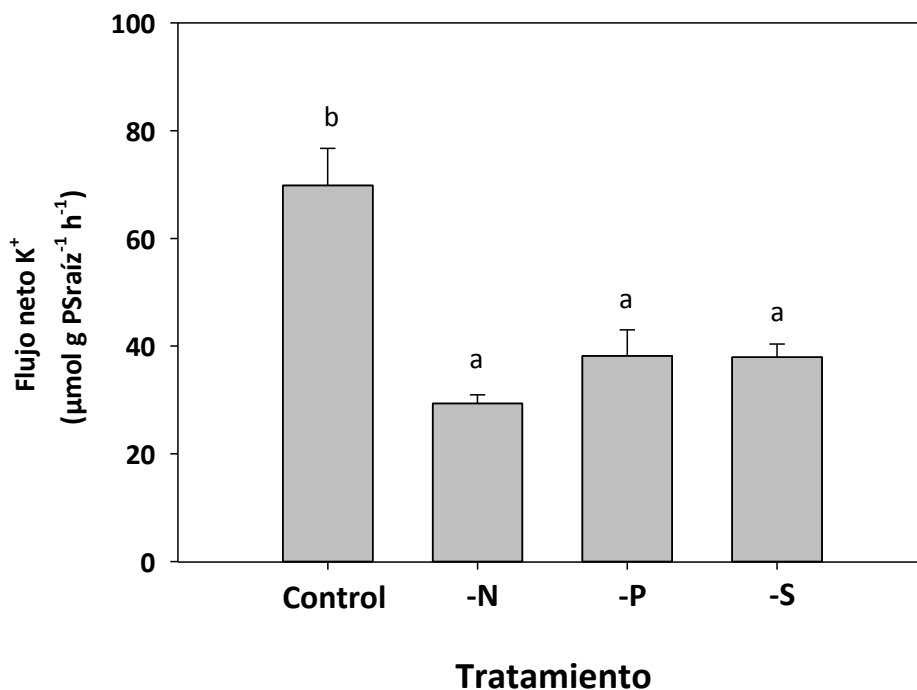


Figura 33. Efecto de las deficiencias nutricionales en el flujo de K^+ en plantas de tomate. Las plantas se crecieron en solución nutritiva completa (control) durante 15 días. Transcurrido este tiempo, 6 plantas se cosecharon (T_0) y el resto se sometieron a los distintos tratamientos durante 7 días (T_1). Entonces, se cosecharon para secar el material vegetal y así determinar las concentraciones de K^+ en los tejidos. El flujo de K^+ se calculó como la diferencia en el contenido total de K^+ por peso seco de raíz y unidad de tiempo, entre las plantas denominadas T_1 y las plantas T_0 . Se muestra la media de 6 repeticiones por tratamiento y las barras con diferentes letras son significativamente diferentes a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

1.2.2- Efecto sobre la translocación de K^+ .

La translocación de K^+ de raíz a la parte aérea se calculó de la forma indicada en MyM apartado 2.1.2.2.1.1.

Puede observarse (Figura 34) cómo las deficiencias nutricionales redujeron significativamente la translocación de K^+ a la parte aérea. Igual que ocurría con las plantas de Arabidopsis, el ayuno de alguno de los nutrientes estudiados llevó a la disminución de la

translocación del K^+ de la raíz a la parte aérea en plantas de tomate. Merece la pena mencionar que, aunque las diferencias entre las distintas deficiencias nutricionales no son significativas, la translocación a la parte aérea se ve más afectada en el caso de la falta de NO_3^- .

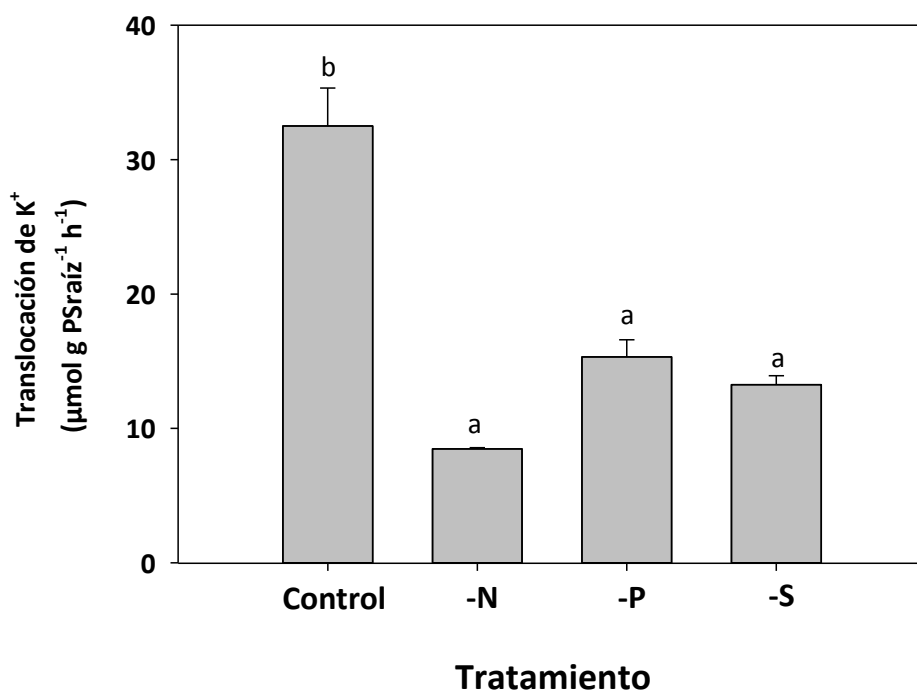


Figura 34. Efecto de las deficiencias nutricionales en la tasa de translocación de K^+ a la parte aérea en plantas de tomate. Las plantas se crecieron en solución nutritiva completa (control) durante 15 días. Transcurrido este tiempo, 6 plantas se cosecharon (T_0) y el resto se sometieron a los distintos tratamientos durante 7 días (T_1). Entonces, se cosecharon para secar el material vegetal y así determinar las concentraciones de K^+ en los tejidos. La tasa de translocación de K^+ se calculó como la diferencia en el contenido total de K^+ en la parte aérea por peso seco de raíz y unidad de tiempo, entre las plantas denominadas T_0 y las plantas T_1 . Se muestra la media de 6 repeticiones por tratamiento y las barras con diferentes letras son significativamente diferentes a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

1.2.3- Efecto sobre el crecimiento.

Transcurridos los experimentos de desaparición de K^+/Rb^+ de la solución externa, y una vez seco el material vegetal, se determinaron los pesos secos de raíz y parte aérea para cada uno de los tratamientos (MyM, apartado 2.1.2.2.1.2) (Tabla 35). Cuando las plantas de tomate se

ayunaron de NO_3^- , o de PO_4^{3-} , el tamaño de la parte aérea es menor que el observado en las plantas tratadas con la solución nutritiva completa; sin embargo, la raíz no se vio afectada por los distintos tratamientos.

Tabla 35. Peso seco (g) de raíz y parte aérea de las plantas de tomate sujetas a los distintos tratamientos de deficiencias nutricionales. Se representa la media de 6 repeticiones y el error estándar. Los valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente distintos a $P=0,05$, según el Test de Tukey. NS indica 'No Significativo'.

Tratamiento	PS (g)	
	Raíz	Parte aérea
Control	0,0426 ± 0,0108 ^{ns}	0,2593 ± 0,0518 ^b
-N	0,0368 ± 0,0071 ^{ns}	0,1381 ± 0,0232 ^a
-P	0,0333 ± 0,0049 ^{ns}	0,1572 ± 0,0247 ^a
-S	0,0493 ± 0,0034 ^{ns}	0,2126 ± 0,019 ^{ab}

1.2.4- Efecto sobre la concentración de K^+ .

La determinación del contenido mineral presente en los tejidos (MyM, apartado 2.1.2.2.1.2) mostró que las plantas sometidas a las deficiencias nutricionales presentaron una reducción significativa de la concentración de K^+ en la parte aérea, siendo esta disminución del 46 % (-N), del 29 % (-P) y del 36 % (-S) en comparación con las plantas control. La concentración de K^+ en la raíz no se afectó de manera significativa, aunque en el tratamiento -N se aprecia un ligero aumento de la misma (Tabla 36).

Tabla 36. Concentraciones de K^+ ($\text{mg}\cdot\text{gPS}^{-1}$) en raíz y parte aérea de plantas de tomate sujetas a los distintos tratamientos. Se representa la media de 6 repeticiones y el error estándar. Los valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente distintos a $P=0,05$, según el Test de Tukey.

Tratamiento	[K^+] (mg gPS^{-1})	
	Raíz	Parte aérea
Control	61,84 ± 2,26 ^{ab}	36,14 ± 2,61 ^b
-N	69,81 ± 1,63 ^b	19,49 ± 0,95 ^a
-P	60,05 ± 2,35 ^a	25,51 ± 2,35 ^a
-S	60,93 ± 1,49 ^{ab}	23,13 ± 1,43 ^a

1.2.5- Efecto sobre la transcripción de los genes *LKT1* y *SISKOR*.

Al igual que en *Arabidopsis*, se estudió la respuesta transcripcional a la ausencia de los nutrientes estudiados de los genes que codifican los canales homólogos a *AKT1* y *SKOR* en tomate, mediante PCR en tiempo real. Para este ensayo, también se incorporaron plantas ayunadas de K^+ .

En tomate se ha descrito el homólogo del gen *AKT1*, *LKT1* (Hartje, S. y col., 2000). En cuanto al gen *SKOR* no se encontró ninguna publicación al respecto. Por ello, se llevó a cabo una búsqueda en el genoma de tomate (Fernandez-Pozo, N. y col., 2015) utilizando la secuencia del gen *AtSKOR* de *Arabidopsis* como referencia. De esta forma, se identificó un homólogo al gen *AtSKOR* de *Arabidopsis*, al que se denominó *SISKOR* (LOC101264389). Los niveles de expresión de estos genes en las raíces de las plantas tratadas se calcularon mediante el método comparativo C_T (MyM, apartado 2.2.2.3.2), utilizando el gen del Factor de Elongación 1α (*SIEF-1 α*) como gen de referencia. Los cebadores utilizados para la amplificación de estos genes se recogen en el Anexo 2.

Como se observa en la Figura 35A, las plantas de tomate ayunadas de K^+ no presentaron variaciones en la expresión del gen *LKT1* respecto a las plantas sin ayunar, mientras que los niveles de expresión de este gen en el resto de tratamientos disminuyeron alrededor de un 50 %. En cuanto al gen *SISKOR* (Figura 35B), se observó la represión de su expresión en todas las condiciones de ayuno de nutrientes.

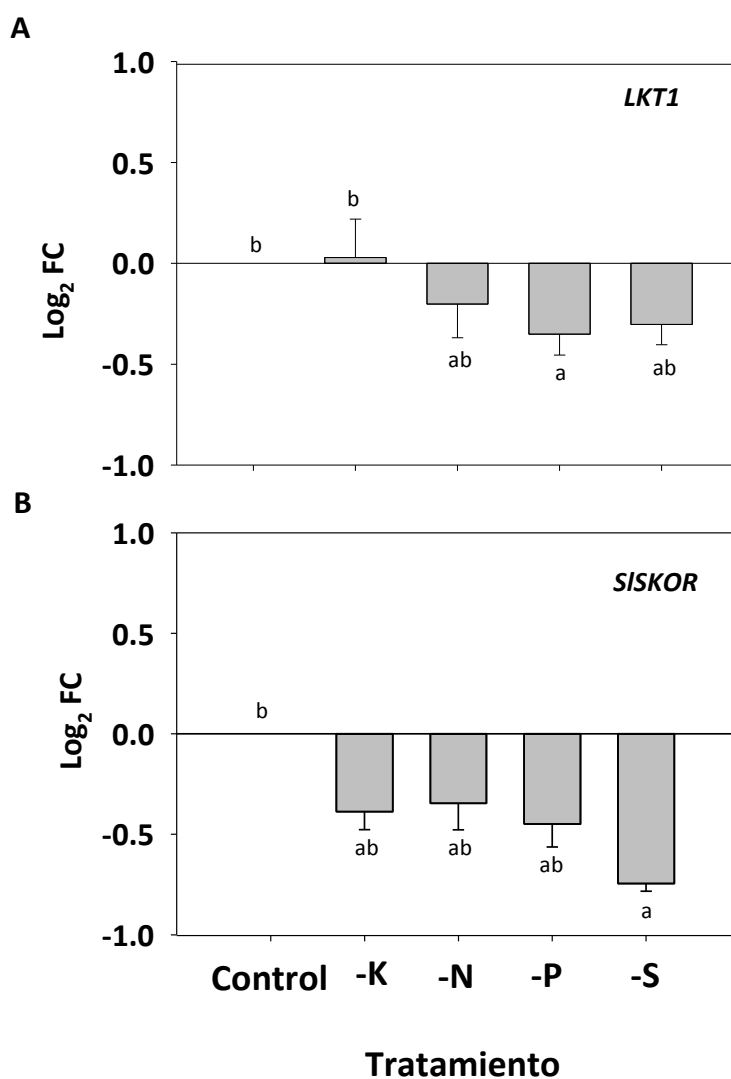


Figura 35. Niveles de expresión de *LKT1* y *SISKOR* en respuesta a las distintas deficiencias nutricionales. Mediante PCR en tiempo real se determinaron los valores de expresión relativos de los genes *LKT1* (A) y *SISKOR* (B) tras el tratamiento de las plantas de tomate en las distintas condiciones estudiadas, respecto a las plantas control, cultivadas en solución nutritiva completa. Los niveles de expresión se muestran como el Log₂ FC en estos genes respecto al gen *SIEF-1α* (control endógeno), y respecto a la muestra calibrador (muestra tratada en la solución completa) según el método comparativo de C_T. Se representa la media de tres repeticiones. Las barras con diferentes letras muestran diferencias significativas a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

2- CARACTERIZACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE K⁺ DE ALTA AFINIDAD EN CONDICIONES DE DEFICIENCIAS NUTRICIONALES.

Se ha descrito que, en *Arabidopsis*, el transportador de K⁺ de alta afinidad AtHAK5 es el único sistema implicado en la absorción de este nutriente a concentraciones inferiores a 10 μ M (Rubio, F. y col., 2010). A concentraciones superiores a 200 μ M, la relevancia de AtHAK5 en la absorción de K⁺ va disminuyendo y aumentando la del canal AKT1. La activación de estos sistemas en función de la disponibilidad de K⁺ en el medio es crucial para la homeostasis de K⁺ en la planta. La transcripción de los genes que codifican transportadores HAK se induce por ayuno de K⁺ en todas las especies estudiadas (Santa-María, G.E. y col., 1997; Ahn, S.J. y col., 2004; Bañuelos, M.A. y col., 2002; Martínez-Cordero, M.A. y col., 2004; Alemán, F. y col., 2009a).

De igual forma que en el apartado de baja afinidad, los experimentos realizados en el rango de alta afinidad se llevaron a cabo tanto en *Arabidopsis* como en tomate, de forma que se pudiesen extender estos estudios a una especie de interés agrícola.

2.1-EFECTO DE DISTINTAS DEFICIENCIAS NUTRICIONALES SOBRE LA ABSORCIÓN DE K⁺ DE ALTA AFINIDAD EN PLANTAS DE ARABIDOPSIS.

Para este estudio se utilizaron plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 silvestre (WT) y el mutante nulo en AKT1, *akt1-2* (Rubio, F. y col., 2008). La utilización del mutante *akt1-2* permitió el estudio en una línea en la que la absorción de K⁺ a concentraciones externas menores de 100 μ M tiene lugar exclusivamente a través del transportador AtHAK5.

Tras la esterilización y germinación de las semillas, las plantas se cultivaron durante 21 días en solución nutritiva 1/5 de Hoagland con todos los nutrientes y se transfirieron a una solución con 0,5 mM de K⁺ durante 7 días para que la concentración interna de K⁺ disminuyera y reducir así la salida de K⁺ al medio externo durante el experimento de desaparición de K⁺/Rb⁺ externo. Posteriormente, se aplicaron los diferentes tratamientos de deficiencias nutricionales (Tabla 37) durante otros 7 días.

Tabla 37. Concentraciones de K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} en las soluciones utilizadas para los distintos tratamientos. * El NO_3^- se añadió en forma de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; para formular la disolución -N, este compuesto fue sustituido por $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. El PO_4^{3-} fue añadido como $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$; para formular la disolución -P, este compuesto fue sustituido por $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. El SO_4^{2-} fue añadido como $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; para formular la solución -S, este compuesto fue sustituido por $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

Tratamiento *	K^+ (mM)	NO_3^- (mM)	PO_4^{3-} (mM)	SO_4^{2-} (mM)
Control	0,5	2,8	0,2	0,35
-K	0	2,8	0,2	0,35
-N	0,5	0	0,2	0,35
-K-N	0,5	0	0,2	0,35
-P	0,5	2,8	0	0,35
-K-P	0	2,8	0	0,35
-S	0,5	2,8	0,2	0
-K-S	0	2,8	0,2	0

2.1.1- Efecto sobre la absorción de K^+ .

Transcurrido el tiempo de tratamiento de deficiencias nutricionales, se llevó a cabo la caracterización de la absorción de K^+ por las raíces de las plantas, mediante la realización de un ensayo de desaparición de Rb^+ presente en una solución externa (MyM, apartado 2.1.2.1.2).

En la Figura 36 se muestra un experimento representativo de la desaparición de Rb^+ externo frente al tiempo, realizado con plantas ayunadas de K^+ y de NO_3^- . Se observa que en las plantas control, cultivadas con solución completa, de ambas líneas WT y *akt1-2*, la concentración de Rb^+ externa disminuye muy levemente durante las 7 horas de experimento. Sin embargo, las plantas ayunadas de K^+ son capaces de agotar completamente el Rb^+ externo. Las plantas ayunadas de NO_3^- muestran un comportamiento similar a las del tratamiento control, mientras que las ayunadas de K^+ y NO_3^- de forma simultánea, agotan el Rb^+ al igual que las ayunadas únicamente de K^+ .

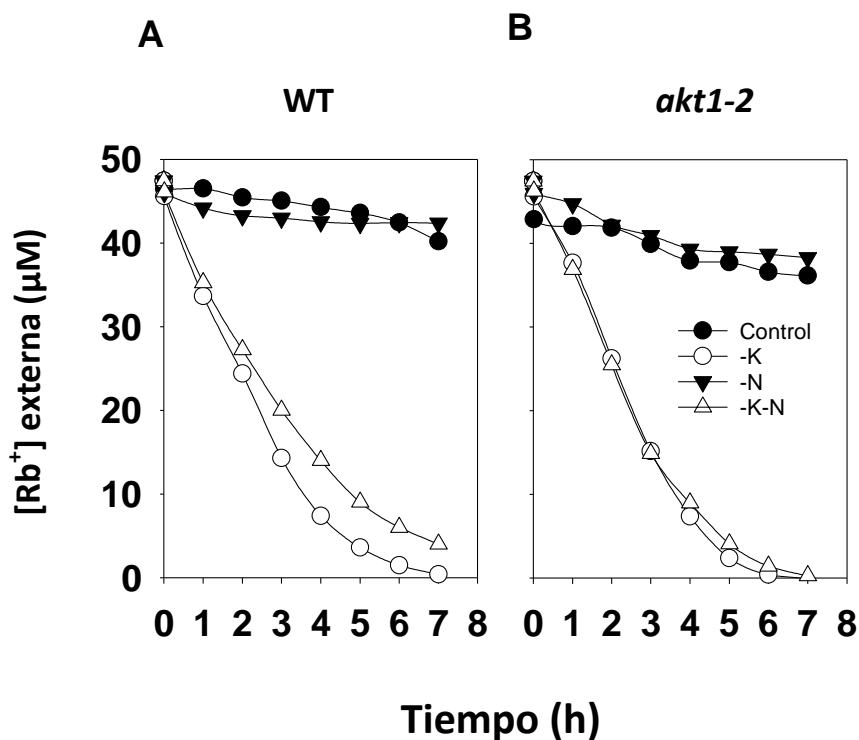


Figura 36. Curvas de desaparición del Rb⁺ presente en una solución externa, por las raíces de plantas de Arabidopsis. Las plantas WT (A) y *akt1-2* (B) cultivadas durante 7 días en solución control (círculos negros) o ayunadas de K⁺ (círculos blancos), de NO₃⁻ (triángulos negros) o de ambas (triángulos blancos), se transfirieron a una solución nutritiva sin K⁺ y con 50 µM de RbCl, y se tomaron muestras de la solución externa, cada hora durante 7 horas, para determinar su concentración de Rb⁺. Se representa las concentraciones de Rb⁺ de la solución externa frente al tiempo.

A partir de los experimentos de desaparición del Rb⁺ externo, se calcularon las velocidades de absorción de Rb⁺ por gramo de peso seco de raíz y por hora (Figura 37). Como se puede observar, únicamente las plantas ayunadas de K⁺, ya sea de forma individual o en combinación con ayuno de NO₃⁻, PO₄³⁻, o SO₄²⁻, muestran altas velocidades de absorción de Rb⁺, compatibles con la inducción del sistema de entrada de K⁺ de alta afinidad. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre las velocidades de absorción de las líneas WT y *akt1-2*, excepto en el tratamiento -K-P, donde la línea *akt1-2* muestra una mayor tasa de absorción de Rb⁺.

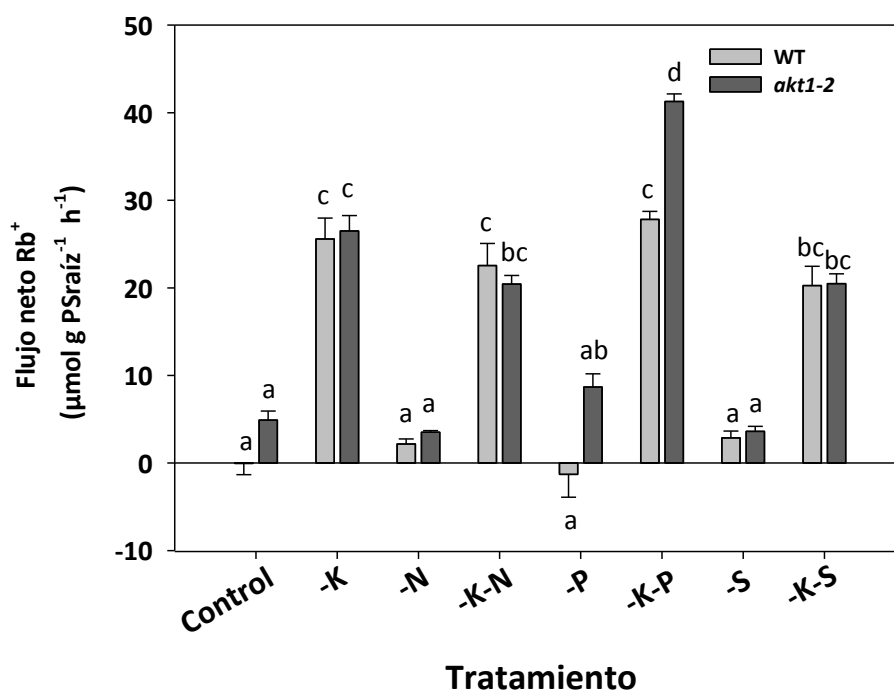


Figura 37. Tasa de absorción de Rb^+ por las raíces de las plantas sometidas a los distintos tratamientos. La tasa de absorción fue calculada como la variación del Rb^+ externo a por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo en WT (barras gris claro) y *akt1-2* (barras gris oscuro). Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con las diferentes letras muestran diferencias significativas a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

2.1.2- Efecto sobre la composición mineral en los tejidos.

Las plantas utilizadas en los experimentos anteriores se sometieron a secado y digestión ácida para determinar su composición mineral mediante espectrometría ICP (MyM, apartado 2.1.2.1.2.2)

Las plantas tratadas en ayuno de K^+ mostraron una disminución de la concentración de dicho nutriente de aproximadamente el 50% respecto a las plantas tratadas en solución control, tanto en parte aérea como en raíz, y en ambas líneas, siendo más pronunciada esta disminución en el mutante *akt1-2* (Tabla 38).

Estos efectos fueron independientes de la presencia o ausencia de NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} en la solución nutritiva, excepto en raíces de WT del tratamiento -N, donde se aprecia una ligera disminución de la concentración de K^+ , y en la parte aérea del mutante *akt1-2* del tratamiento -S, donde la concentración de K^+ no se redujo de manera significativa.

Tabla 38. Concentraciones de K⁺ (mg·gPS⁻¹) en raíz y parte aérea de plantas de Arabidopsis (WT y *akt1-2*) sometidas a los distintos tratamientos. Se representa la media de 6 repeticiones y el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas al 95 % ($P < 0,05$) según el Test de Tukey. El análisis de la varianza se ha llevado a cabo sobre un diseño factorial. ‘*’, ‘**’ y ‘***’ indican efecto significativo a $P < 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente. ‘ns’ indica que no hay efecto significativo al 5 %.

Genotipo	Tratamiento	[K ⁺] (mg gPS ⁻¹)	
		Raíz	Parte aérea
WT	Control	33,63 ± 1,56	32,62 ± 1,05
	-K	22,73 ± 1,17	16,44 ± 1,05
	-N	29,52 ± 1,70	30,47 ± 1,66
	-K-N	19,70 ± 2,02	17,72 ± 1,82
	-P	37,25 ± 2,26	25,51 ± 2,04
	-K-P	22,56 ± 2,26	11,84 ± 2,04
	-S	37,54 ± 1,84	33,05 ± 2,35
	-K-S	28,47 ± 2,60	18,22 ± 2,35
<i>akt1-2</i>	Control	31,99 ± 1,30	19,11 ± 1,17
	-K	17,53 ± 1,30	11,46 ± 1,17
	-N	29,06 ± 2,60	18,91 ± 1,82
	-K-N	16,72 ± 2,02	12,68 ± 1,82
	-P	30,06 ± 2,26	18,21 ± 2,04
	-K-P	18,28 ± 2,26	10,44 ± 2,04
	-S	35,61 ± 2,60	17,57 ± 1,66
	-K-S	24,85 ± 2,60	15,12 ± 2,35
Interacción:			
Tratamiento	Control	32,65 ^{cde}	26,61 ^c
	-K	20,42 ^{ab}	14,23 ^a
	-N	29,38 ^{cd}	25,22 ^c
	-K-N	18,21 ^a	15,20 ^a
	-P	33,65 ^{de}	21,86 ^b
	-K-P	20,42 ^{ab}	11,14 ^a
	-S	36,90 ^e	22,73 ^c
	-K-S	26,66 ^{bc}	16,67 ^a
Genotipo	WT	28,93 ± 0,70	22,24 ± 0,66
	<i>akt1-2</i>	25,51 ± 0,77	14,44 ± 0,6
Análisis de Varianza (Valor F)			
Tratamiento (T)		28,89 ^{***}	28,40 ^{***}
Genotipo (G)		10,77 ^{**}	72,49 ^{***}
T x G		0,63 ^{ns}	4,74 ^{***}

Como era de esperar, las plantas tratadas en ausencia de cada nutriente mostraron una menor concentración de ese nutriente tanto en parte aérea como en raíz (Tablas 39, 40 y 41).

En la Tabla 39 se observa que el ayuno exclusivamente de K⁺ también originó una disminución significativa en la concentración de NO₃⁻ en raíces del mutante *akt1-2*.

Tabla 39. Concentraciones de NO₃⁻ (mg·gPS⁻¹) en raíz y parte aérea de plantas de Arabidopsis (WT y *akt1-2*) sometidas a los distintos tratamientos. Se representa la media de 6 repeticiones y el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas al 95 % ($P < 0,05$) según el Test de Tukey. El análisis de la varianza se ha llevado a cabo sobre un diseño factorial. ‘*’, ‘**’ y ‘***’ indican efecto significativo a $P < 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente. ‘ns’ indica que no hay efecto significativo al 5 %.

Genotipo	Tratamiento	[NO ₃ ⁻] (mg gPS ⁻¹)	
		Raíz	Parte aérea
WT	Control	0,62 ± 0,06	3,00 ± 0,87
	-K	0,46 ± 0,04	2,92 ± 0,64
	-N	0,13 ± 0,05	0,11 ± 0,06
	-K-N	0,12 ± 0,05	0,13 ± 0,05
<i>akt1-2</i>	Control	0,49 ± 0,07	3,80 ± 0,87
	-K	0,22 ± 0,04	3,34 ± 0,94
	-N	0,10 ± 0,05	0,05 ± 0,02
	-K-N	0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,03
Interacción:			
Tratamiento	Control	0,56 ^c	3,34 ^b
	-K	0,33 ^b	3,06 ^b
	-N	0,11 ^a	0,08 ^a
	-K-N	0,10 ^a	0,09 ^a
Genotipo	WT	0,34 ± 0,03	1,51 ± 0,14
	<i>akt1-2</i>	0,23 ± 0,03	1,81 ± 0,15
Análisis de Varianza (Valor F)			
Tratamiento (T)		29,90 ^{***}	79,99 ^{***}
Genotipo (G)		9,18 ^{**}	1,74 ^{ns}
T x G		2,51 ^{ns}	1,03 ^{ns}

Tabla 40. Concentraciones de PO_4^{3-} ($\text{mg}\cdot\text{gPS}^{-1}$) en raíz y parte aérea de plantas de *Arabidopsis* (WT y *akt1-2*) sometidas a los distintos tratamientos. Se representa la media de 6 repeticiones y el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas al 95 % ($P < 0,05$) según el Test de Tukey. El análisis de la varianza se ha llevado a cabo sobre un diseño factorial. ‘*’, ‘**’ y ‘***’ indican efecto significativo a $P < 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente. ‘ns’ indica que no hay efecto significativo al 5 %.

Genotipo	Tratamiento	[PO_4^{3-}] (mg gPS^{-1})	
		Raíz	Parte aérea
WT	Control	9,22 ± 0,60	6,79 ± 0,38
	-K	10,53 ± 0,60	6,86 ± 0,38
	-P	6,40 ± 0,92	3,68 ± 0,5
	-K-P	6,51 ± 0,80	3,10 ± 0,5
<i>akt1-2</i>	Control	9,66 ± 0,80	7,93 ± 0,38
	-P	10,53 ± 0,60	7,46 ± 0,38
	-P	6,59 ± 0,80	4,31 ± 0,5
	-K-P	6,87 ± 0,80	4,14 ± 0,5
Interacción:			
Tratamiento	Control	9,38 ^b	7,36 ^b
	-K	10,53 ^b	7,16 ^b
	-P	6,51 ^a	3,99 ^a
	-K-P	6,69 ^a	3,62 ^a
Genotipo	WT	8,16 ± 0,37	5,11 ± 0,22
	<i>akt1-2</i>	8,41 ± 0,38	5,96 ± 0,22
Análisis de Varianza (Valor F)			
Tratamiento (T)		15,42 ^{***}	7,34 ^{**}
Genotipo (G)		0,21 ^{ns}	40,57 ^{***}
T x G		0,04 ^{ns}	0,21 ^{ns}

Al igual que ocurre con el NO_3^- , el ayuno de PO_4^{3-} da lugar a una menor concentración de éste en ambos tejidos. Se observó que las plantas WT tratadas en ayuno de K^+ , contenían mayores concentraciones de PO_4^{3-} en raíces (Tabla 40).

El ayuno de K^+ no afectó de manera significativa a las concentraciones de SO_4^{2-} en la parte aérea y raíz, ni de la línea WT ni del mutante *akt1-2* (Tabla 41).

Tabla 41. Concentraciones de SO_4^{2-} ($\text{mg}\cdot\text{gPS}^{-1}$) en raíz y parte aérea de plantas de *Arabidopsis* (WT y *akt1-2*) sometidas a los distintos tratamientos. Se representa la media de 6 repeticiones y el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas al 95 % ($P < 0,05$) según el Test de Tukey. El análisis de la varianza se ha llevado a cabo sobre un diseño factorial. ‘*’, ‘**’ y ‘***’ indican efecto significativo a $P < 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente. ‘ns’ indica que no hay efecto significativo al 5 %.

Genotipo	Tratamiento	[SO_4^{2-}] (mg gPS^{-1})	
		Raíz	Parte aérea
WT	Control	12,29 ± 0,54	8,95 ± 0,52
	-K	11,23 ± 0,41	8,25 ± 0,52
	-S	6,83 ± 0,62	5,91 ± 0,79
	-K-S	7,99 ± 0,62	6,04 ± 0,79
<i>akt1-2</i>	Control	10,25 ± 0,48	10,18 ± 0,52
	-K	11,31 ± 0,41	9,25 ± 0,52
	-S	7,26 ± 0,62	7,06 ± 0,69
	-K-S	7,54 ± 0,62	7,73 ± 0,79
Interacción:			
Tratamiento	Control	11,16 ^b	9,57 ^b
	-K	11,27 ^b	8,75 ^b
	-S	7,05 ^a	6,57 ^a
	-K-S	7,77 ^a	6,88 ^a
Genotipo	WT	9,59 ± 0,28	7,29 ± 0,34
	<i>akt1-2</i>	9,09 ± 0,27	8,56 ± 0,32
Análisis de Varianza (Valor F)			
Tratamiento (T)		34,56 ^{***}	10,39 ^{***}
Genotipo (G)		1,67 ^{ns}	7,42 ^{**}
T x G		2,26 ^{ns}	0,09 ^{ns}

2.1.3- Efecto sobre la transcripción del gen *AtHAK5*.

Las plantas sometidas a los tratamientos descritos en la Tabla 37, también se destinaron al estudio de la respuesta transcripcional del gen *AtHAK5* a la falta de estos nutrientes en el medio. De igual forma a como se había procedido anteriormente, se llevó a cabo la extracción de ARN y síntesis de ADNc (MyM, apartados 2.2.2.1 y 2.2.2.2), para cuantificar los niveles de ARNm de *AtHAK5* mediante RT-qPCR, utilizando como gen de referencia al gen *AtACT2*. Los cebadores utilizados para la amplificación de ambos genes se exponen en el Anexo 2.

En plantas WT, la deficiencia de cada nutriente de forma individual incrementó la expresión de *AtHAK5*, aunque no de manera significativa para los tratamientos -P y -S (Figura 38). Por otra parte, la combinación de la deficiencia de K⁺ con la deficiencia de NO₃⁻, PO₄³⁻ y SO₄²⁻, originó un aumento en la expresión de *AtHAK5* en todos los casos, y con niveles similares a los producidos por ayuno de K⁺ de forma individual.

En la línea *akt1-2*, todos los tratamientos dieron lugar a un incremento significativo de la expresión de *AtHAK5* respecto a WT, incluyendo el tratamiento control. En los tratamientos -P y -S, los niveles de expresión de *AtHAK5* fueron similares a los producidos en el tratamiento control, mientras que en condiciones de ayuno de K⁺, de NO₃⁻ y en todas las combinaciones (-K-N, -K-P y -K-S) el incremento fue mayor, siendo el -K-N el que presentó mayores niveles de expresión de *AtHAK5*.

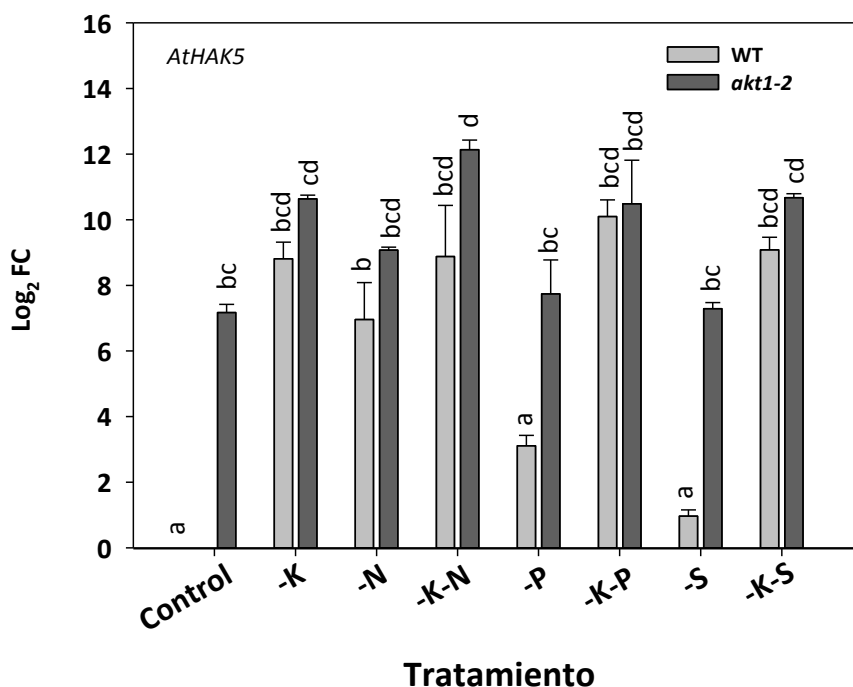


Figura 38. Niveles de expresión de *AtHAK5* en respuesta a las deficiencias de nutrientes. Mediante PCR en tiempo real se determinaron los valores de expresión del gen *AtHAK5* en las plantas de WT (barras gris claro) y *akt1-2* (barras gris oscuro) tras el tratamiento en las distintas deficiencias nutricionales, respecto a las plantas control, cultivadas en solución nutritiva completa. Los niveles de expresión se muestran como el Log₂ FC del gen *AtHAK5* respecto al gen endógeno *AtACT2*, y respecto a la muestra calibrador (muestra control en solución completa) según el método comparativo C_T. Se representa la media de tres repeticiones. Las barras con diferentes letras muestran diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey.

2.2- EFECTOS DE DISTINTAS DEFICIENCIAS NUTRICIONALES SOBRE LA ABSORCIÓN DE K⁺ DE ALTA AFINIDAD EN PLANTAS DE TOMATE.

Para complementar el estudio de absorción de K⁺ en el rango de alta afinidad, se realizaron ensayos similares a los descritos en Arabidopsis, en plantas de tomate cultivar Micro-Tom.

2.2.1- Efecto de las deficiencias nutricionales sobre la absorción de K⁺.

La capacidad de absorción de K⁺ de alta afinidad en plantas de tomate sujetas a los distintos tratamientos nutricionales (Tabla 37) se determinó mediante un ensayo de desaparición del K⁺ presente en una solución externa frente al tiempo, como se indica en MyM apartado 2.1.2.2.2. A diferencia del ensayo realizado en Arabidopsis, en las plantas de tomate el experimento duró 3 horas y se realizó tanto con K⁺ como con Rb⁺. El uso de Rb⁺ permitió determinar exclusivamente el influjo del mismo y descartar que los efectos observados en los experimentos de desaparición sean debidos a cambios en el eflujo.

Las plantas crecidas en SN control durante 20 días y expuestas a continuación a los diferentes tratamientos durante 7 días, se transfirieron a contenedores individuales con aireadores, que contenían solución nutritiva con 100 μM de K⁺. Se tomaron muestras de la solución cada 15 minutos durante 3 horas, y las concentraciones de K⁺ de cada muestra se determinaron mediante EAA y se representaron frente al tiempo.

En la Figura 39 se muestra un experimento representativo de la desaparición de K⁺ externo para los tratamientos control, deficiencia de K⁺, deficiencia de NO₃⁻ y deficiencia de K⁺ y NO₃⁻. Se observó que únicamente las plantas de los tratamientos que incluyeron deficiencia de K⁺, agotaron todo el K⁺ de la solución externa.

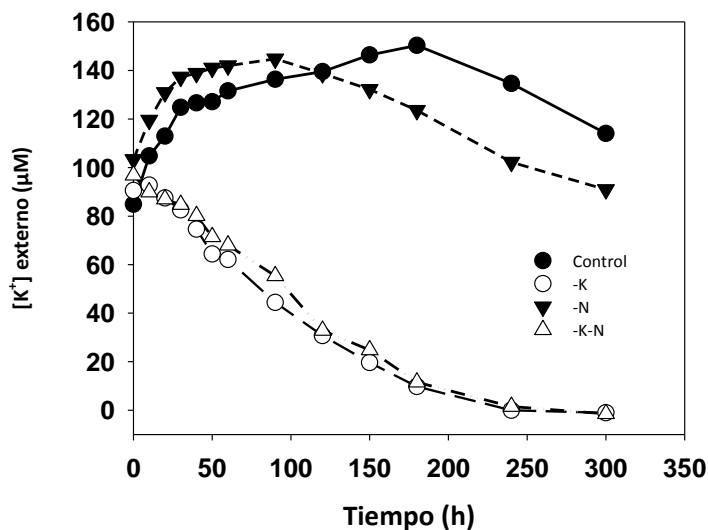


Figura 39. Curvas de desaparición del K^+ presente en medio externo por raíces de plantas de tomate. Las plantas sometidas durante 7 días a solución control (círculos negros) o ayunadas de K^+ (círculos blancos), de NO_3^- (triángulos negros) o de ambas (triángulos blancos), se transfirieron a una solución nutritiva con 100 μM de KCl, y se tomaron muestras a intervalos para determinar las concentraciones de K^+ . Se representa las concentraciones de K^+ de la solución externa frente al tiempo.

Estos experimentos se repitieron para todos los tratamientos. En la Figura 40 se muestra la tasa del flujo de K^+ calculado a partir de los datos de desaparición de K^+ externo de las plantas sometidas a los distintos tratamientos. Se observó que todos los tratamientos que incluían deficiencia de K^+ dieron lugar a valores positivos de flujo, que indican entrada neta del mismo; así como el tratamiento de deficiencia de NO_3^- , aunque en este caso menor medida. El resto de tratamientos no mostraron absorción de K^+ de la solución externa, como indica el valor negativo de flujo de K^+ .

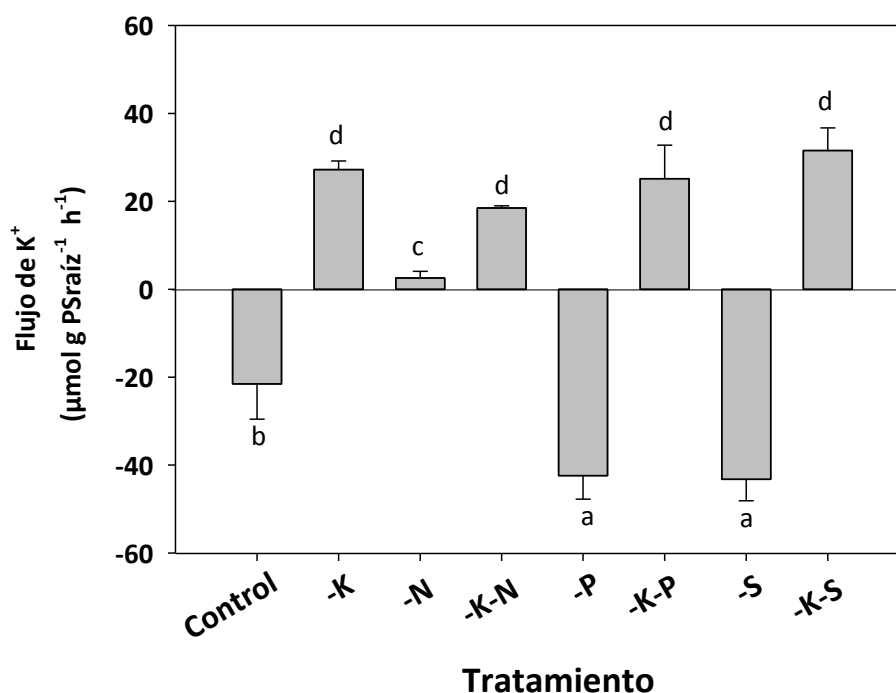


Figura 40. Tasa de flujo de K⁺ de las raíces de las plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos. Se calculó como la variación de la concentración de K⁺ en la solución externa por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con las diferentes letras muestran que existe diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

Durante las horas que dura el ensayo de desaparición, puede producirse un eflujo de K⁺ a través de canales de salida de K⁺, que enmascare el influjo de K⁺. Para estudiar esta posibilidad, se realizaron los mismos experimentos añadiendo 10 mM de tetraetilamonio (TEA), un bloqueante de canales de K⁺ (Very, A.A. y Sentenac, H., 2002; Hoopen, F.T. y col., 2010) a la solución externa. Los valores del flujo neto de K⁺ fueron similares en ausencia y en presencia de 10 mM de TEA (Figura 41), por lo que los valores obtenidos se debían exclusivamente a un influjo de K⁺. Por otra parte, el sistema por el que entra el K⁺ en estas condiciones, muy probablemente SIHAK5 (Nieves-Cordones, 2007; 2008), parece ser insensible a TEA.

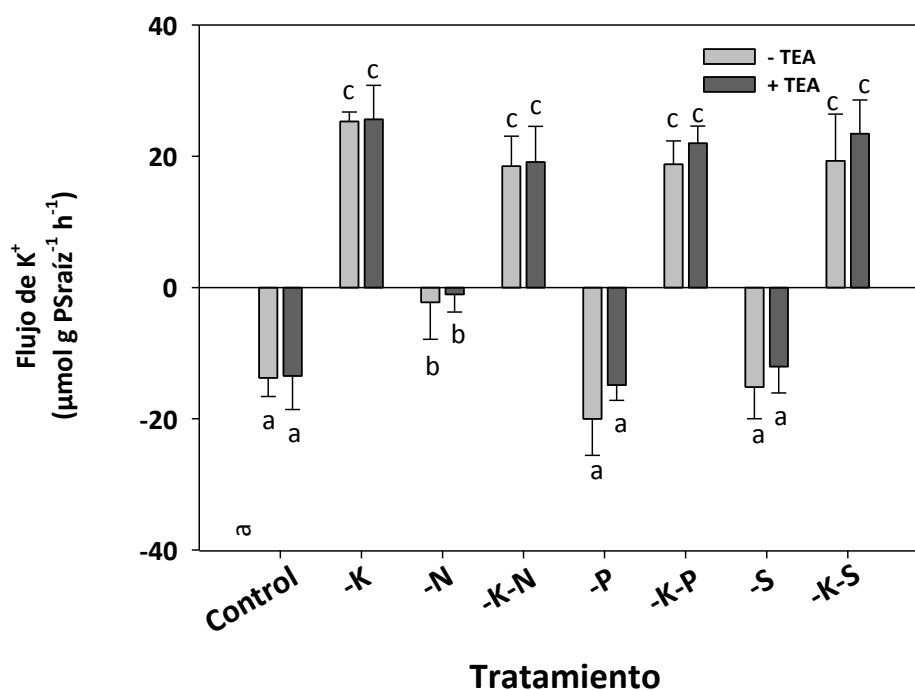


Figura 41. Efecto de la presencia de TEA en el flujo de K^+ en raíces de plantas de tomate expuestas a las diferentes deficiencias nutricionales. El flujo de K^+ se determinó de igual forma que en la Figura 40, en ausencia (barras gris claro) o en la presencia (barras gris oscuro) de 10 mM de TEA en la solución externa. Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con las diferentes letras muestran que existe diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

Para corroborar que los efectos observados eran debidos a variaciones del influjo de K^+ , se llevó a cabo el mismo ensayo con 100 μM de Rb^+ en lugar de K^+ (Figura 42). De igual forma, los valores en el flujo de Rb^+ coincidieron con los obtenidos en el ensayo con K^+ , por lo que no se producía eflujo de K^+ durante las 5 horas de experimento y los efectos de las deficiencias nutricionales eran exclusivamente debidos a variaciones del influjo de K^+ .

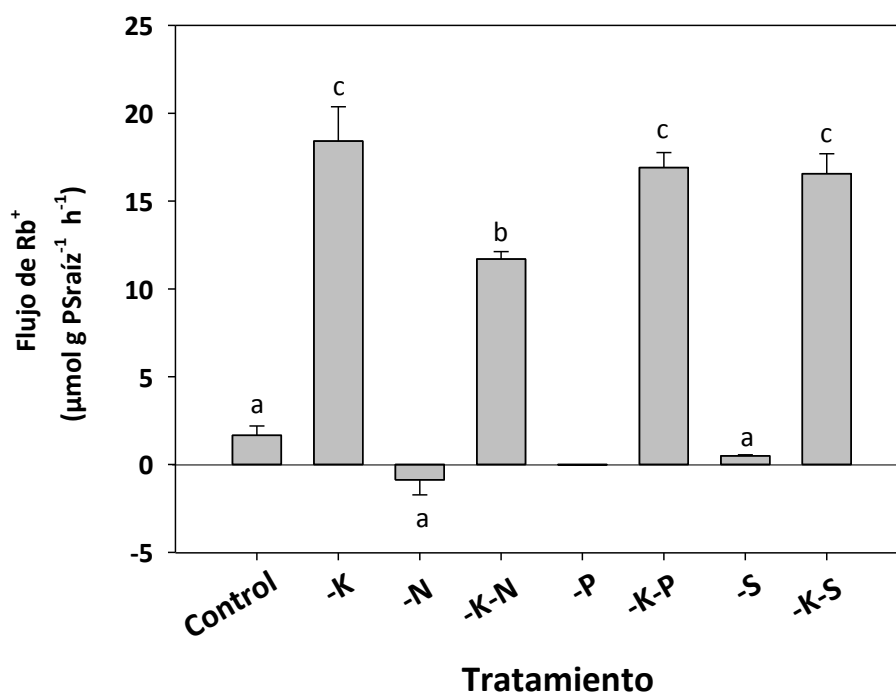


Figura 42. Tasa de flujo de Rb⁺ en plantas de tomate expuestas a los diferentes tratamientos de deficiencias nutricionales. Se calculó la tasa de flujo de Rb⁺ como la variación de la cantidad de Rb⁺ en la solución externa por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con las diferentes letras muestran que existe diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

2.2.2- Efecto sobre la composición mineral en los tejidos.

La determinación del contenido mineral presente en los tejidos (MyM, apartado 2.1.2.2.1.2), mostró que el ayuno de K⁺ produjo una disminución de la concentración de K⁺ de unas 3 veces en la raíz y de 2 veces en la parte aérea, respecto a las plantas no ayunadas (Tabla 42). Cuando la ausencia de K⁺ iba acompañada por la deficiencia de otro nutriente, la concentración de K⁺ disminuyó a valores similares al de las plantas tratadas en ausencia exclusiva de K⁺. En condiciones de ayuno de NO₃⁻, la concentración de K⁺ aumentó en la raíz y disminuyó en la parte aérea, de manera significativa en ambos casos. Sin embargo, por ayuno de PO₄³⁻ y SO₄²⁻, la concentración de K⁺ no varió en la raíz respecto al control, pero si disminuyó de manera significativa en la parte aérea.

Tabla 42. Concentraciones de K^+ ($mg\ gPS^{-1}$) en raíz y parte aérea de plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos. Valores obtenidos de 3 repeticiones. La misma letra en la misma columna corresponde a valores no significativos a $P=0,05$, según el Test de Tukey.

Tratamiento	$[K^+]$ ($mg\ gPS^{-1}$)	
	Tomate	
	Raíz	Parte aérea
Control	62,5 ^b	33,5 ^d
-K	17,3 ^a	8,5 ^a
-N	74,1 ^c	27,5 ^c
-K-N	21,4 ^a	13,8 ^b
-P	59,7 ^b	28,0 ^c
-K-P	14,7 ^a	10,8 ^{ab}
-S	66,0 ^b	26,2 ^c
-K-S	15,2 ^a	9,3 ^{ab}

La concentración de NO_3^- disminuyó tanto en parte aérea como en raíz cuando las plantas se sometieron a ayuno de K^+ , siendo esta disminución en la parte aérea similar a la producida cuando se ayunaron de NO_3^- y cuando se ayunaron de ambos nutrientes (-K-N) (Tabla 43).

Tabla 43. Concentraciones de NO_3^- ($mg\cdot gPS^{-1}$) en raíz y parte aérea de plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos. Valores obtenidos de 3 repeticiones. La misma letra en la misma columna corresponde a valores no significativos a $P=0,05$, según el Test de Tukey.

Tratamiento	$[NO_3^-]$ ($mg\ gPS^{-1}$)	
	Tomate	
	Raíz	Parte aérea
Control	61,1 ^c	23,1 ^b
-K	43,1 ^b	5,0 ^b
-N	9,1 ^a	7,0 ^a
-K-N	8,5 ^a	6,3 ^a

En cuanto al resto de nutrientes, el ayuno de K^+ no influyó en las concentraciones de PO_4^{3-} en ninguno de los tejidos estudiados (Tabla 44), mientras que la concentración de SO_4^{2-} disminuyó ligeramente en ambos tejidos (Tabla 45).

Tabla 44. Concentraciones de PO_4^{3-} ($\text{mg}\cdot\text{gPS}^{-1}$) en raíz y parte aérea de plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos. Valores obtenidos de 3 repeticiones. La misma letra en la misma columna corresponde a valores no significativos a $P=0,05$, según el Test de Tukey.

Tratamiento	$[\text{PO}_4^{3-}]$ (mg gPS^{-1})	
	Tomate	
	Raíz	Parte aérea
Control	10,55 ^b	0,74 ^b
-K	9,3 ^b	0,8 ^b
-P	2,91 ^a	0,21 ^a
-K-P	2,69 ^a	0,25 ^a

Tabla 45. Concentraciones de SO_4^{2-} ($\text{mg}\cdot\text{gPS}^{-1}$) en raíz y parte aérea de plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos. Valores obtenidos de 3 repeticiones. La misma letra en la misma columna corresponde a valores no significativos a $P=0,05$, según el Test de Tukey.

Tratamiento	$[\text{SO}_4^{2-}]$ (mg gPS^{-1})	
	Tomate	
	Raíz	Parte aérea
Control	3,57 ^c	3,51 ^c
-K	3,2 ^b	3,12 ^{ab}
-S	2,24 ^a	2,76 ^a
-K-S	2,31 ^a	2,80 ^a

2.2.3- Efecto sobre la transcripción del gen *SIHAK5*.

De igual forma que en las plantas de *Arabidopsis*, se estudió la respuesta del gen *SIHAK5* en las plantas de tomate sometidas a las distintas deficiencias nutricionales mediante PCR en tiempo real. Tras el cultivo durante 21 días en solución completa y 7 días en las soluciones con los tratamientos de deficiencias nutricionales (Tabla 37), se extrajo el ARN de raíces y se sintetizó el ADNc correspondiente (MyM, apartados 2.2.2.1 y 2.2.2.2). De igual forma a como se ha descrito para el gen *AtHAK5*, se analizó la expresión de *SIHAK5* mediante PCR en tiempo real, utilizando el gen *SIEF-1 α* como control interno de referencia.

En las plantas sometidas a ayuno de K^+ el gen *SIHAK5* se indujo unas 20 veces, y estos valores de expresión son similares a los obtenidos cuando el ayuno es de NO_3^- o de PO_4^{3-} . (Figura 43). Sin embargo, el ayuno de SO_4^{2-} no indujo la expresión de *SIHAK5* de manera significativa. Por otra parte, la falta de K^+ junto con la deficiencia de NO_3^- (-K-N) y de SO_4^{2-} (-K-S), dio lugar al aumento en la expresión de *SIHAK5* también a niveles similares a los obtenidos por

ayuno de K^+ . El tratamiento -K-P produjo la mayor expresión de *SIHAK5*, siendo ésta de unas 100 veces respecto al tratamiento control.

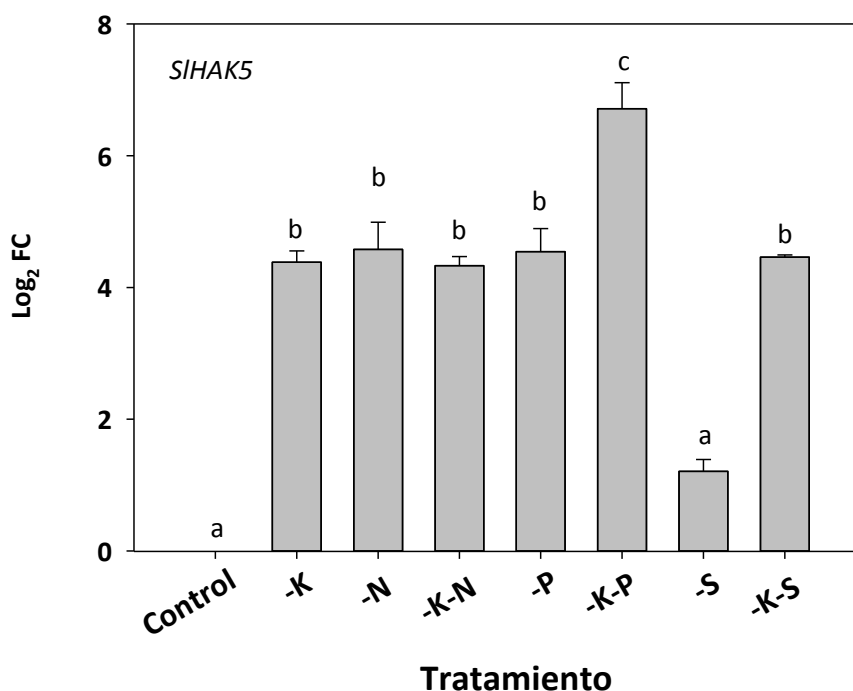


Figura 43. Niveles de expresión de *SIHAK5* en respuesta a las distintas deficiencias nutricionales. Mediante PCR a tiempo real se determinaron los valores de expresión del gen *SIHAK5* en las plantas de tomate tras el tratamiento en las distintas deficiencias nutricionales, respecto a las plantas control, cultivadas en solución nutritiva completa. Los niveles de expresión se muestran como el Log₂ del FC de *SIHAK5* respecto al gen endógeno *SIEF-1 α* , y respecto a la muestra calibrador (muestra control en solución completa) según el método comparativo de C_T . Se representa la media de tres repeticiones. Las barras con diferentes letras muestran diferencias significativas a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sobre el estudio del efecto de deficiencias nutricionales sobre la absorción de K^+ en el rango de bajo afinidad muestran que en las plantas WT de Arabidopsis, la absorción a través del canal de K^+ AKT1 disminuye cuando hay deficiencia de NO_3^- , PO_4^{3-} o SO_4^{2-} (Figura 25). El uso de la línea doble mutante *hak5-3akt1-2* permitió determinar el efecto de estas deficiencias nutricionales sobre el sistema alternativo a AKT1 que opera en este rango de concentraciones de K^+ de la baja afinidad, y que no está identificado a nivel molecular, aunque se ha sugerido que podría tratarse de un canal no selectivo de cationes (NSCC) (Caballero, F. y col., 2012). En el mutante *hak5-3 akt1-2*, la falta de NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} produjo una disminución de la absorción de Rb^+ (Figura 25), lo que indica que este sistema diferente a AKT1 aún por identificar, se vería afectado en el mismo sentido que AKT1 por las deficiencias nutricionales.

Por los resultados obtenidos en tomate, podríamos decir que el sistema LKT1 estaría contribuyendo de manera significativa a la adquisición de K^+ en las condiciones experimentales estudiadas. Por una parte, el sistema de transporte de K^+ de alta afinidad en tomate, *SIHAK5*, está completamente reprimido en este rango de concentraciones (1,4 mM K^+) (Nieves-Cordones, M. y col., 2007; Nieves-Cordones, M. y col., 2008). Por otra, la sensibilidad a Cs^+ observada en la absorción de K^+ de baja afinidad (Figura 31B) sugiere que LKT1 estaría implicado, ya que los canales de rectificadores de entrada de K^+ , como AKT1 son muy sensibles a Cs^+ (Amtmann, A. y Sanders, D., 1999). En condiciones de deficiencias nutricionales (NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-}), la entrada de K^+ en el rango de baja afinidad disminuyó (Figura 31A) y también se inhibió por la presencia de Cs^+ , hasta un 50 % (Figura 31B). Por tanto, en condiciones control y bajo deficiencia de nutrientes, al menos la mitad de la absorción de K^+ se llevaría a cabo por un canal selectivo de K^+ , sensible al Cs^+ , muy probablemente el homólogo a AKT1 en tomate, LKT1. Sin embargo, el Cs^+ no inhibió totalmente la absorción, ni en condiciones control ni bajo deficiencias nutricionales, lo que indica que existe un sistema insensible a Cs^+ implicado en la entrada de K^+ que, como se ha sugerido en Arabidopsis, podría ser un NSCC (Caballero, F. y col., 2012). La entrada de K^+ a través de este sistema alternativo a LKT1 también disminuiría en condiciones de deficiencia de nutrientes.

Esta disminución de la absorción de K^+ en el rango de baja afinidad observada como consecuencia de las deficiencias nutricionales estudiadas (Figuras 25 y 31A), podría deberse a la represión de los genes *AKT1* y *LKT1* en Arabidopsis y tomate, respectivamente. Aunque los

Resultados y Discusión: Capítulo 1

niveles de expresión de *AKT1* y *LKT1* no se vieron afectados por el ayuno de K^+ (Figuras 29A y 35A), de acuerdo con estudios previos que observaron que la transcripción de *AKT1* no se induce por ayuno de K^+ (Kellermeier, F. y col., 2014; Pilot, G. y col., 2003a), la regulación transcripcional de estos sistemas se ha visto modificada en respuesta a las distintas deficiencias nutricionales estudiadas (Figuras 29A y 35A). Por otra parte, un estudio transcriptómico con micromatrices en *Arabidopsis* mostró que el suplemento de NO_3^- induce la expresión de *AKT1* en raíces (Gifford, M.L. y col., 2008), lo que estaría de acuerdo con la represión de *AKT1* observada en esta Tesis Doctoral en situación de ayuno de NO_3^- (Figura 29A).

Junto con una disminución de la absorción, se observó que las deficiencias nutricionales estudiadas produjeron una disminución de la translocación del K^+ de la raíz a la parte aérea, tanto en *Arabidopsis* como en tomate (Figuras 26 y 34). Esta disminución podría ser simplemente consecuencia de la menor absorción de K^+ a través de *AKT1* o *LKT1* en *Arabidopsis* y tomate respectivamente. Sin embargo, la represión de los niveles de *AtSKOR* y *SISKOR* indica que se estaría produciendo un efecto específico sobre la translocación del K^+ por la ausencia de estos nutrientes (Figuras 29B y 35B). La reducción de los niveles de *AtSKOR* por falta de K^+ , NO_3^- y PO_4^{3-} ya se había demostrado previamente (Kellermeier, F. y col., 2014). A diferencia del estudio de Kellermeier, F. y col., (2014), en esta Tesis Doctoral también se muestra represión de los niveles de expresión de *AtSKOR* por ayuno de SO_4^{2-} . El uso del mutante *skor-1* de *Arabidopsis*, indicó que existiría una vía alternativa para la translocación de K^+ independiente del canal *SKOR* y esta alternativa también se vería afectada por la deficiencia de nutrientes (Figura 27). Esta vía alternativa podría estar constituida por el transportador de NO_3^- , *NRT1.5*, en *Arabidopsis*, ya que se ha demostrado que éste participa, de forma sinérgica con el canal *AtSKOR*, en la translocación del K^+ desde la raíz hasta la parte aérea, y esta función es dependiente de la presencia de NO_3^- (Drechsler, N. y col., 2015a).

En el apartado 2 del Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, se describe un estudio enfocado a los efectos del ayuno de los macronutrientes K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} sobre la absorción de K^+ de alta afinidad en plantas de *Arabidopsis* y tomate.

En *Arabidopsis*, la entrada de K^+ de alta afinidad está mediada fundamentalmente por *AtHAK5*, aunque el canal *AKT1* también contribuye en cierta medida (Alemán, F. y col., 2011). Para estudiar el transporte de K^+ de alta afinidad mediado exclusivamente por *AtHAK5*, se utilizó el mutante *akt1-2*, donde el único sistema de entrada de K^+ en el rango de

concentraciones utilizado es el transportador *AtHAK5*. En plantas de tomate se ha demostrado que la absorción de K^+ en este rango de concentraciones es llevada a cabo principalmente por *SlHAK5* (Nieves-Cordones, M. y col., 2007).

En este estudio se muestra que los genes que codifican el transportador de K^+ de alta afinidad HAK5 en *Arabidopsis* y en tomate (*AtHAK5* y *SlHAK5*, respectivamente) se indujeron en situaciones de ayuno de NO_3^- y PO_4^{3-} (Figuras 38 y 43) pero no se produjo absorción de K^+ en el rango de alta afinidad (Figuras 37 y 40). Sin embargo, la falta de estos nutrientes junto con ayuno de K^+ sí dio lugar a una absorción de K^+ de alta afinidad (Figuras 37 y 40). Estos resultados indican que el transportador HAK5 podría estar sujeto a regulación postranscripcional para ser funcional, y ésta regulación podría estar ligada a la falta de K^+ .

El hecho de que sí se produzca absorción de K^+ en las condiciones $-K-P$ y $-K-N$, descarta la posibilidad de que el estado de deficiencia nutricional de NO_3^- o de PO_4^{3-} interfiera en el proceso de producción de un transportador HAK5 funcional. Esos tratamientos no disminuyeron la concentración de K^+ en las raíces, pero junto con ayuno de K^+ , las concentraciones de este catión en las raíces fueron similares a las obtenidas en condiciones de ayuno exclusivo de K^+ (Tablas 38 y 42). Por tanto, aunque el gen *HAK5* pueda ser inducido por señales nutricionales distintas a la falta de K^+ , el transportador HAK5 es funcional únicamente cuando hay ayuno de K^+ y las concentraciones de K^+ en las raíces disminuyen.

A diferencia del ayuno de NO_3^- y PO_4^{3-} la falta de SO_4^{2-} no dio lugar a la inducción de *AtHAK5* ni de *SlHAK5* y tampoco se observó absorción de K^+ . Sin embargo, el ayuno de K^+ y de SO_4^{2-} sí llevó a la inducción de ambos genes (Figuras 38 y 43) y también a una absorción de K^+ de alta afinidad (Figuras 37 y 40).

Los resultados presentados sugieren la existencia de una regulación postranscripcional de los transportadores HAK5 en plantas. Aunque la inducción del gen pueda deberse a diversos estímulos, es necesario que exista una señal de bajo K^+ para que se active funcionalmente el transportador HAK5. Estos mecanismos de activación podrían ser los responsables de conferir especificidad para responder a una señal de bajo K^+ .

En los últimos años se han llevado a cabo estudios que revelan que la respuesta de las plantas a la disponibilidad de K^+ en el medio conlleva una serie de eventos que son comunes a los ocurridos en las rutas señalización de la respuesta a la disponibilidad de otros nutrientes. Por ejemplo, uno de los primeros eventos que ocurren ante la falta de un nutriente es un

cambio en el potencial de membrana de las células de la raíz (Amtmann, A. y col., 2006); distintas deficiencias nutricionales podrían inducir los mismos componentes de señalización, como el incremento en las ROS (Shin, R. y col., 2005; Schachtman, D.P. y Shin, R., 2007); otros estudios muestran que la falta de un nutriente conlleva cambios en la transcripción de genes que codifican transportadores de otros nutrientes (Wang, Y.-H. y col., 2002; Maathuis, F.J.M. y col., 2003; Nikiforova, V. y col., 2003); y también se ha observado que las cascadas de señalización de la adaptación de la arquitectura de la raíz a la disponibilidad de los nutrientes en el medio comparten elementos comunes (Kellermeier, F. y col., 2014). Todo esto indica la existencia de interacciones entre las vías de señalización de las plantas de la respuesta a las distintas deficiencias nutricionales (Amtmann, A. y Blatt, M.R., 2009; Wang, Y. y Wu, W.-H., 2013).

La regulación de HAK5, AKT1 Y SKOR está destinada a la adquisición y homeostasis del K^+ en plantas. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la disponibilidad de otros nutrientes podría afectar a la regulación de estos sistemas de transporte de K^+ (Wang, Y.-H. y col., 2002; Schachtman, D.P. y Shin, R., 2007; Tsay, Y.-F. y col., 2011). De los resultados obtenidos en este capítulo se puede concluir que la absorción de K^+ llevada a cabo por los canales AKT1 y LKT1, en Arabidopsis y tomate, respectivamente, se ve disminuida cuando las raíces de las plantas están ayunadas de NO_3^- , PO_4^{3-} o de SO_4^{2-} , y esta menor absorción puede ser consecuencia de la represión del gen *AKT1* o *LKT1* observada en estas condiciones. También se observó una menor translocación del K^+ de la raíz a la parte aérea, que podría ser debida a la represión que se produce del gen de SKOR, el canal de K^+ con mayor relevancia en la translocación (Gaymard, F. y col., 1998). Estos efectos se observaron tanto en Arabidopsis como en tomate.

Por otra parte, los resultados obtenidos del estudio llevado a cabo en el rango de alta afinidad revelan la existencia de una regulación a nivel postranscripcional del transportador HAK5. La falta de NO_3^- , PO_4^{3-} o de SO_4^{2-} en la solución nutritiva produjo una inducción del gen *HAK5* pero no activó la absorción de K^+ por las raíces de las plantas. Sin embargo, cuando el ayuno de estos nutrientes estaba acompañado de ayuno de K^+ , sí se produjo absorción. Por tanto, una señal de bajo K^+ parece necesaria para que se lleve a cabo la activación del transportador HAK5.

CAPÍTULO 2:

ESTUDIO DEL TRANSPORTADOR DE K⁺ DE ALTA AFINIDAD HAK5

1-ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL TRANSPORTADOR DE K⁺ DE ALTA AFINIDAD *SIHAK5* EN PLANTAS DE TOMATE.

Las plantas perciben los cambios en la disponibilidad de K⁺ en el medio y se generan señales moleculares para responder ante esas situaciones. Se ha observado que existe una regulación a nivel transcripcional de los genes que codifican transportadores de K⁺, factores de regulación y componentes de señalización bajo condiciones de ayuno de K⁺ (Armengaud, P. y col., 2004; Gierth, M. y col., 2005; Ma, T.-L. y col., 2012). En *Arabidopsis*, se han llevado a cabo numerosos estudios que han permitido identificar algunas de las moléculas y los procesos implicados en la adaptación de las plantas a la baja disponibilidad de K⁺ en el medio. Estos son cambios en el potencial de membrana y en los niveles de ROS, Ca²⁺ y hormonas como el etileno y el ácido jasmónico.

En condiciones de ayuno de K⁺ se produce una rápida y fuerte inducción del gen *AtHAK5* y un aumento de la capacidad de absorción de K⁺ (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Gierth, M. y col., 2005). Uno de los primeros efectos hallados durante la deficiencia de K⁺ es la hiperpolarización del potencial de membrana de las células de la raíz, la cual aparece tras solo unos minutos del descenso del K⁺ externo (Maathuis, F.J.M. y Sanders, D., 1993b; Wang, Y. y Wu, W.-H., 2010). También se ha descrito que se producen incrementos de etileno que estarían participando en la regulación de la transcripción del gen *AtHAK5* a través de la señalización por ROS en condiciones de ayuno de K⁺ externo (Jung, J.Y. y col., 2009; Kim, M.J. y col., 2010) y que numerosos factores de transcripción (FT) parecen estar implicados en la regulación de *AtHAK5*, como RAP2.11 (Kim, M.J. y col., 2012) y ARF2 (Zhao, S. y col., 2016).

En este apartado se presentan dos estudios cuyo objetivo común es dilucidar los mecanismos implicados en la respuesta de adaptación de las plantas de tomate a la deficiencia de K⁺ en el medio, a nivel de la transcripción del gen *HAK5*. Se aborda el estudio de la señalización a través de la hiperpolarización del potencial de membrana, así como a través del etileno y las ROS. (Figura 44). Estos experimentos se han llevado a cabo en plantas de tomate con el fin de extrapolar resultados obtenidos en la planta modelo *A. thaliana* a una especie de alto interés agroalimentario como es el tomate.

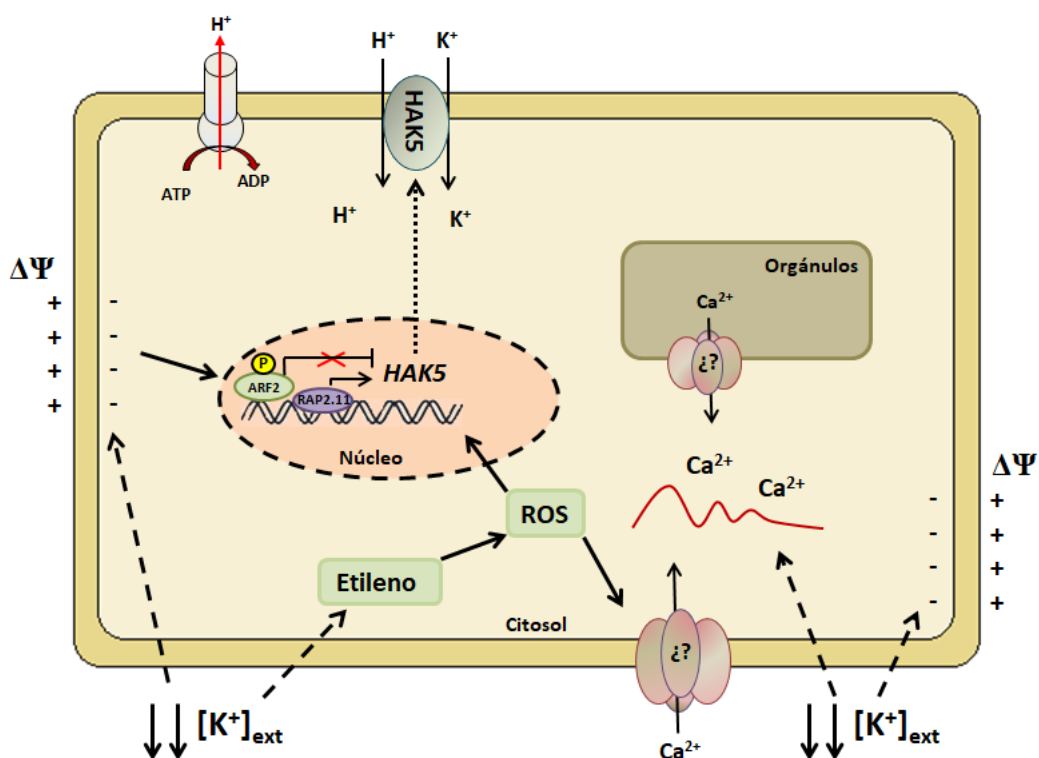


Figura 44. Mecanismos implicados en la señalización y regulación transcripcional en respuesta a la deficiencia de K^+ externo en raíces de Arabidopsis. Un descenso en las concentraciones externas de K^+ ($[K^+]_{ext}$) origina una hiperpolarización de la membrana plasmática en las células de la epidermis y córtex de la raíz, lo que podría constituir el primer paso en la señalización por bajo K^+ . La percepción de la deficiencia de K^+ produce un aumento en el contenido de etileno y de ROS, lo que lleva a la inducción del gen *AtHAK5*. En la inducción de *AtHAK5* en respuesta a bajo K^+ también estarían implicados factores de transcripción como *RAP2.11*, y *ARF2*. La señal de Ca^{2+} citoplasmático detectada en condiciones de bajo K^+ externo podría proceder de su eflujo desde orgánulos reservorios o del exterior, a través de canales de Ca^{2+} no identificados. La 'X' en rojo, indica inhibición de la función.

1.1- INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS CÉLULAS DE RAÍZ SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE *SIHAK5*.

Se ha demostrado que el Ca^{2+} disminuye la despolarización de la membrana plasmática originada por altas concentraciones de Na^+ en el medio (Shabala, S. y col., 2006). Este suceso previene la pérdida de K^+ en condiciones salinas porque mantiene la fuerza motriz para la acumulación del mismo (Shabala, S. y col., 2006; Shabala, S. y col., 2003). El efecto del Ca^{2+} sobre el potencial de membrana podría influir sobre la transcripción de los transportadores *HAK5*, puesto que existe correlación entre la expresión de los genes que codifican este transportador en *Arabidopsis* (*AtHAK5*) y en tomate (*SIHAK5*), y el potencial de membrana (Nieves-Cordones, M. y col., 2008; Rubio, F. y col., 2014).

Teniendo esto en cuenta, se planteó estudiar la influencia de distintos niveles de Ca^{2+} sobre la despolarización de la membrana plasmática originada por la presencia de Na^+ , y la consiguiente repercusión sobre la transcripción de *SIHAK5* y la absorción de K^+ en el rango de alta afinidad en plantas de tomate.

1.1.1- Efecto de la presencia de Na^+ y Ca^{2+} sobre la absorción de K^+ de alta afinidad.

Las semillas de tomate, cultivar Micro-Tom, fueron germinadas en las condiciones descritas en MyM apartado 1.3.2.1. Tras su cultivo durante 15 días en solución 1/10 de Hoagland modificada, las plantas se crecieron durante una semana en una solución nutritiva sin K^+ , tratadas con dos niveles de Ca^{2+} en combinación con cinco concentraciones distintas de Na^+ (Tabla 46). Estos tratamientos con distintas concentraciones de Ca^{2+} y Na^+ tenían como objetivo evaluar la influencia de estos cationes sobre la inducción de la absorción de K^+ de alta afinidad que se origina tras un ayuno de K^+ . A diferencia del resto de cultivos realizados en esta Tesis Doctoral, se utilizó la SN de Hoagland modificada diluida 1/10 con el fin de tener una solución control de partida con bajo Ca^{2+} (0,75 mM). Esto suponía una concentración de K^+ baja (0,75 mM), pero suficiente para no inducir la absorción de K^+ de alta afinidad.

Tabla 46. Concentraciones de K^+ , Ca^{2+} y Na^+ en las soluciones utilizadas para los distintos tratamientos.

*El Ca^{2+} se añadió en forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ hasta 0,75 mM; y el resto hasta 5 mM en forma de CaCl_2 ; el Na^+ se añadió en forma de NaCl .

Tratamiento *	K^+ (mM)	Ca^{2+} (mM)	Na^+ (mM)
Control	0,75	0,75	0
-K	0	0,75	0
0,75 Ca + 0 Na	0	0,75	0
0,75 Ca + 10 Na	0	0,75	10
0,75 Ca + 20 Na	0	0,75	20
0,75 Ca + 25 Na	0	0,75	25
0,75 Ca + 30 Na	0	0,75	30
5 Ca + 0 Na	0	5	0
5 Ca + 10 Na	0	5	10
5 Ca + 20 Na	0	5	20
5 Ca + 25 Na	0	5	25
5 Ca + 30 Na	0	5	30

Resultados y Discusión: Capítulo 2

Transcurridos los 7 días, las plantas se transfirieron a recipientes individuales para determinar su capacidad para absorber el K^+ . Esta capacidad se determinó mediante un ensayo de desaparición del K^+ presente en una solución externa, que consistió en solución control 1/10 Hoagland modificada ($0,75 \text{ mM Ca}^{2+}$ y sin Na^+ añadido) suplementada con $50 \text{ }\mu\text{M K}^+$, como se indica en MyM, apartado 2.1.2.2.1. Se tomaron muestras de la solución externa de K^+ cada 15 minutos durante 4 horas y las concentraciones de K^+ de cada muestra se determinaron mediante EAA y se representaron frente al tiempo.

En la Figura 45 se muestra un experimento representativo de desaparición de K^+ de la solución externa con raíces de plantas tratadas en ausencia o presencia de 10 mM de Na^+ y con dos niveles de Ca^{2+} . Como se ha visto anteriormente, el ayuno de K^+ durante una semana produce la inducción del sistema de absorción de K^+ de alta afinidad. En la Figura 45A se observa cómo la presencia de 10 mM de Na^+ en la solución de crecimiento produjo una disminución de la absorción de K^+ por parte de dichas plantas cuando el Ca^{2+} presente en la solución de crecimiento es bajo ($0,75 \text{ mM}$); sin embargo, cuando se trataron con Na^+ y una concentración alta de Ca^{2+} , las plantas presentaron una curva de desaparición de K^+ similar a las plantas crecidas en ausencia de Na^+ (Figura 45B).

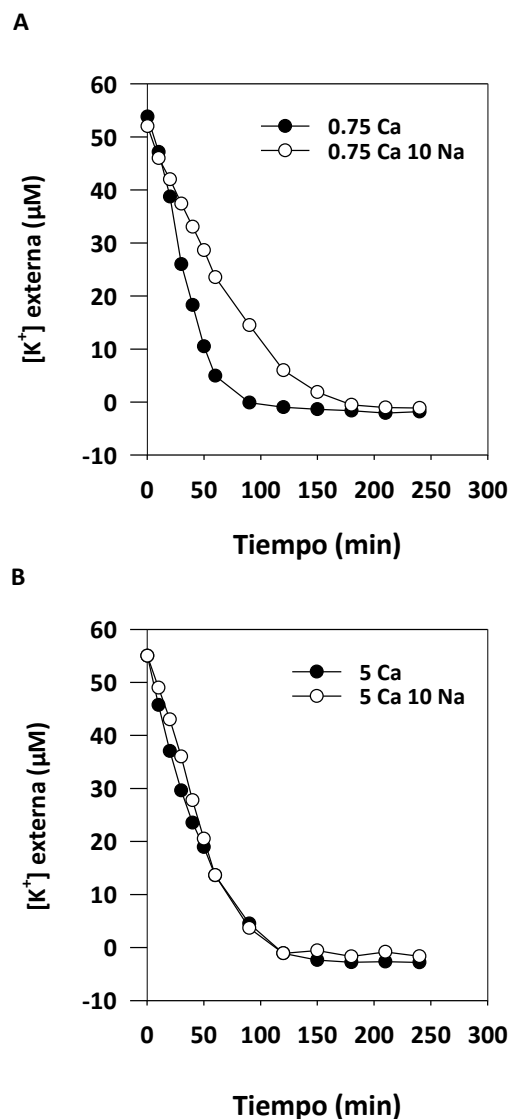


Figura 45. Curvas de desaparición de K^+ en plantas tratadas en ausencia o presencia de 10 mM de Na^+ y dos niveles de Ca^{2+} (0,75 y 5 mM). Las plantas de tomate fueron tratadas durante 1 semana en condiciones de ayuno de K^+ y ausencia (círculos negros) o en presencia (círculos blancos) de 10 mM de Na^+ , a 0,75 (A) o 5 (B) mM de Ca^{2+} . Tras este tratamiento se transfirieron a la solución de transporte que consistió en solución control 1/10 Hoagland modificada (0,75 mM Ca^{2+} y sin Na^+ añadido) suplementada con 50 μM K^+ . Se tomaron muestras de la solución externa cada 15 minutos durante 4 horas, y se representó la concentración de K^+ presente en cada muestra frente al tiempo.

Para caracterizar los efectos de Na^+ y Ca^{2+} sobre la inducción de la absorción de K^+ de alta afinidad, se calcularon las tasas de absorción de K^+ como la disminución de K^+ en la solución externa por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo (Figura 46). El incremento en las concentraciones de Na^+ en la solución nutritiva de crecimiento durante el tratamiento de 7 días redujo de manera significativa las tasas de absorción de K^+ , y esta disminución dependió del nivel de Ca^{2+} presente en dicha solución de crecimiento. Mientras que a bajo Ca^{2+} el incremento de Na^+ originó reducciones en la tasa de absorción de K^+ , la presencia de alto Ca^{2+}

llevó a una menor reducción de dicha tasa. En concreto, a 0,75 mM de Ca^{2+} la presencia de 10 o 20 mM de Na^+ redujo en un 40 % la tasa de absorción de K^+ , mientras que a 5 mM de Ca^{2+} esta reducción no llegaba al 20 %.

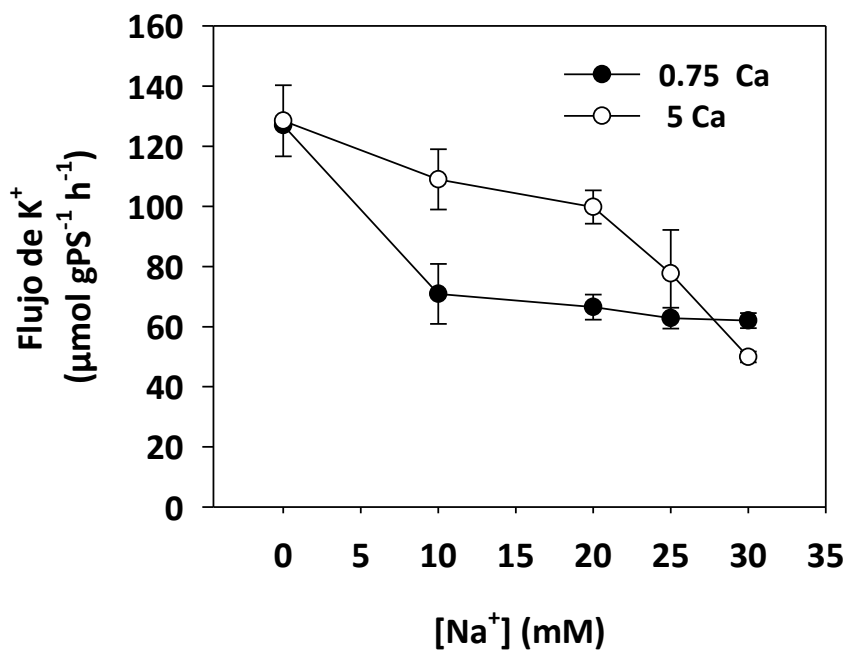


Figura 46. Tasa de absorción de K^+ por parte de raíces de plantas de tomate tratadas durante 7 días en condiciones de ayuno de K^+ y en presencia de 0,75 mM (círculos negros) o 5 mM de Ca^{2+} (círculos blancos) y en ausencia o presencia de distintas concentraciones de Na^+ (10, 20, 25 y 30 mM). La absorción de K^+ se determinó como el K^+ desaparecido de la solución externa por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Se muestra la media de 3 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar.

Para estudiar la contribución de cada uno de los sistemas, SIHAK5 y LKT1, a la absorción de K^+ en estas condiciones estudiadas, se realizó un experimento de desaparición de K^+ en presencia de 1 mM de NH_4^+ o 1 mM de Ba^{2+} , conocidos inhibidores de estos dos sistemas, respectivamente (Rubio, F. y col., 2008). Las plantas se crecieron de igual forma que el experimento anterior, ayunadas de K^+ en dos niveles distintos de Ca^{2+} y ausencia o presencia de 20 mM de Na^+ . Esta concentración de Na^+ fue la elegida porque mostraba claras diferencias en la absorción de K^+ entre los dos niveles de Ca^{2+} (Figura 46). En estos experimentos descritos, se calculó la tasa de absorción de K^+ como la variación de K^+ de la solución externa por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Como se observa en la Figura 47, la presencia de 1 mM de NH_4^+ inhibió de forma importante la absorción de K^+ mientras que la presencia de 1 mM de Ba^{2+} la incrementó.

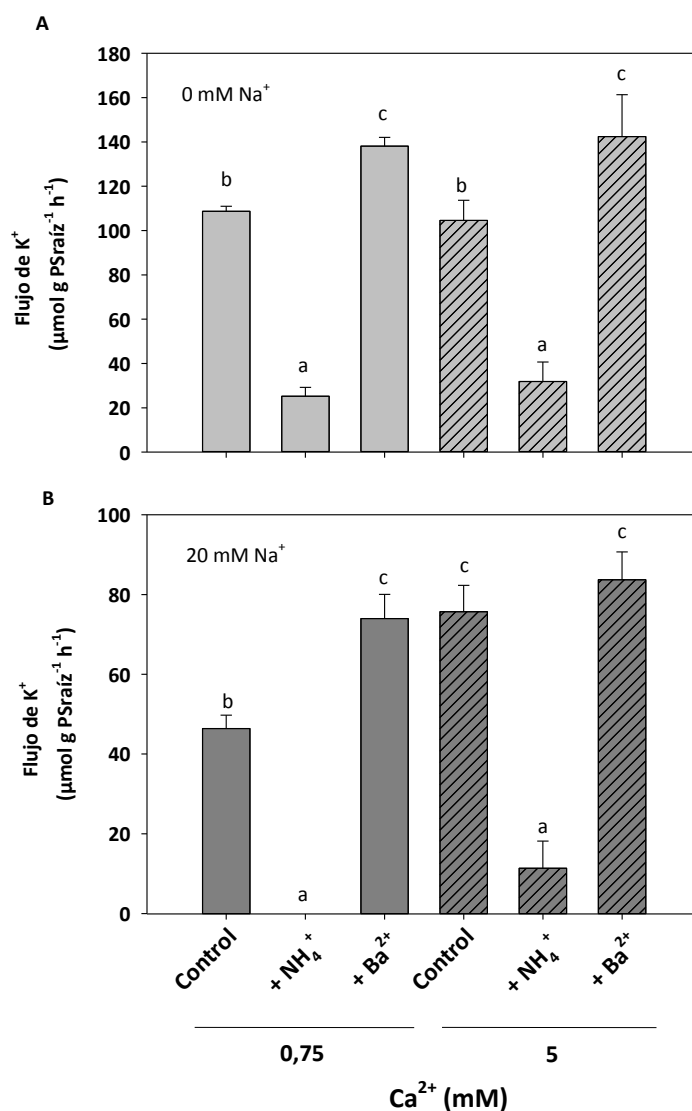


Figura 47. Efecto de la presencia de 1 mM de NH₄⁺ o 1 mM de Ba²⁺ en la solución externa sobre la absorción de K⁺. Las plantas se crecieron y se trataron durante 7 días en ayuno de K⁺ y en ausencia (A) o en presencia (B) de 20 mM de Na⁺ y 0,75 (barras lisas) o 5 (barras rayadas) mM de Ca²⁺. Entonces, se sometieron a un experimento de desaparición de K⁺ como se indica en la Figura 46, en ausencia o en presencia de 1 mM de NH₄⁺ o de 1 mM de Ba²⁺. Se muestra la media de 3 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar.

Para comprobar si se producía eflujo de K⁺ durante el tiempo que duraban los experimentos, estos mismos ensayos se llevaron a cabo en presencia de 10 mM de TEA, (Figura 48), un inhibidor de los canales de eflujo de K⁺ (Hoopen, F.T. y col., 2010; Very, A.A. y Sentenac, H., 2002). La presencia de TEA no afectó las tasas de flujo de K⁺ en estos experimentos y se descartó que se estuviese produciendo eflujo de K⁺.

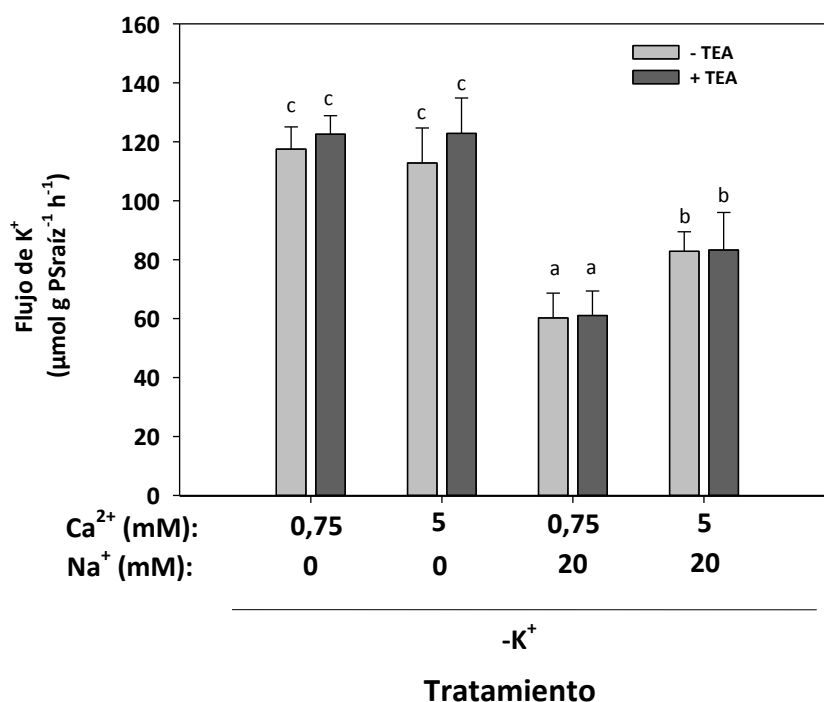


Figura 48. Efecto de la presencia de TEA sobre la absorción de K⁺ de alta afinidad en presencia de Na⁺ y Ca²⁺. Las plantas se crecieron y se trataron durante 7 días en ayuno de K⁺, a 0,75 mM de Ca²⁺ y en ausencia de Na⁺; a 5 mM de Ca²⁺ y ausencia de Na⁺; a 5 mM de Ca²⁺ en presencia de 20 mM de Na⁺ y a 0,75 mM de Ca²⁺ y presencia de 20 mM de Na⁺. Entonces, se sometieron a un experimento de desaparición de K⁺ desde la solución externa con 50 µM de K⁺ y ausencia (barras gris claro) o en presencia (barras gris oscuro) de 10 mM de TEA. Se muestra la media de 3 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar.

1.1.2- Efecto de la presencia de Na⁺ y Ca²⁺ sobre el crecimiento.

Una vez concluido el experimento de desaparición de K⁺, las plantas se llevaron a una estufa a 65 °C durante 3 días para secar el material vegetal y así determinar los pesos secos de raíz y parte aérea, con el fin de ver cómo afectaron los distintos tratamientos al crecimiento de las plantas de tomate.

En cuanto a la parte aérea, se observó que el ayuno de K⁺ no produjo ningún efecto en el tamaño, ni tampoco los tratamientos con Na⁺ y Ca²⁺, respecto a las plantas control (crecidas en solución nutritiva completa) (Figura 49A). Tampoco las raíces de las plantas ayunadas se vieron afectadas al crecer en ausencia de K⁺; sin embargo, la presencia de Na⁺ produjo un aumento de en el peso de la raíz en los dos niveles de Ca²⁺, con excepción de alto Ca²⁺ y 30 mM de Na⁺, tratamiento que redujo el peso de la raíz (Figura 49B).

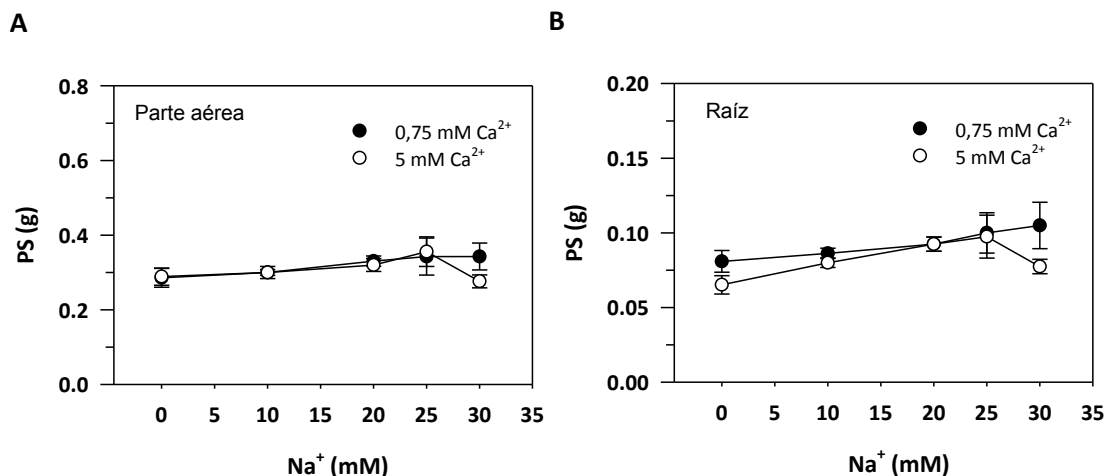


Figura 49. Pesos secos de parte aérea (A) y raíz (B) de las plantas sometidas a los distintos tratamientos. Se muestra la media de 3 plantas por tratamiento. Las barras indican el error estándar.

1.1.3- Efecto de la presencia de Na⁺ y Ca²⁺ sobre las concentraciones de K⁺ en los tejidos.

El material vegetal seco se sometió a digestión ácida y fue analizado mediante ICP para determinar las concentraciones de los minerales presentes en los tejidos (MyM, apartado 2.1.2.2.2.2). En la Figura 50 se muestran las concentraciones de K⁺, Ca²⁺ y Na⁺ de parte aérea y raíz de las plantas sometidas a los distintos tratamientos.

El tratamiento de ayuno de K⁺ produjo una disminución de la concentración de K⁺ tanto en la raíz como en la parte aérea de todas las plantas y en todos los tratamientos estudiados respecto a las plantas control (crecidas en solución nutritiva completa) (Figura 50 A y B). La presencia de Na⁺ no afectó de manera significativa a la concentración de K⁺ en la parte aérea mientras que el nivel alto de Ca²⁺ produjo un aumento de K⁺ (Figura 50A). En cuanto a la concentración de K⁺ en la raíz, podemos observar que en ausencia de Na⁺, las plantas tratadas con mayor Ca²⁺ retienen más K⁺ que aquellas que crecieron con niveles bajos de Ca²⁺. La presencia de Na⁺ redujo las concentraciones de K⁺ en ambos niveles de Ca²⁺ de forma similar cuando las concentraciones de Na⁺ eran de 10 o de 20 mM. A mayores concentraciones de Na⁺, la concentración de K⁺ en las raíces de las plantas tratadas en un nivel alto de Ca²⁺ fueron superiores a las de las raíces tratadas en un nivel bajo de Ca²⁺ (Figura 50B).

Las concentraciones de Ca²⁺ en la parte aérea (Figura 50C) y en la raíz (Figura 50D) se afectaron de forma similar. Las plantas crecidas con el nivel alto de Ca²⁺ mostraron mayores

concentraciones de Ca^{2+} que las tratadas con un nivel bajo Ca^{2+} . El incremento de Na^+ en la solución de tratamiento produjo la disminución de forma significativa de las concentraciones de Ca^{2+} en dichas plantas.

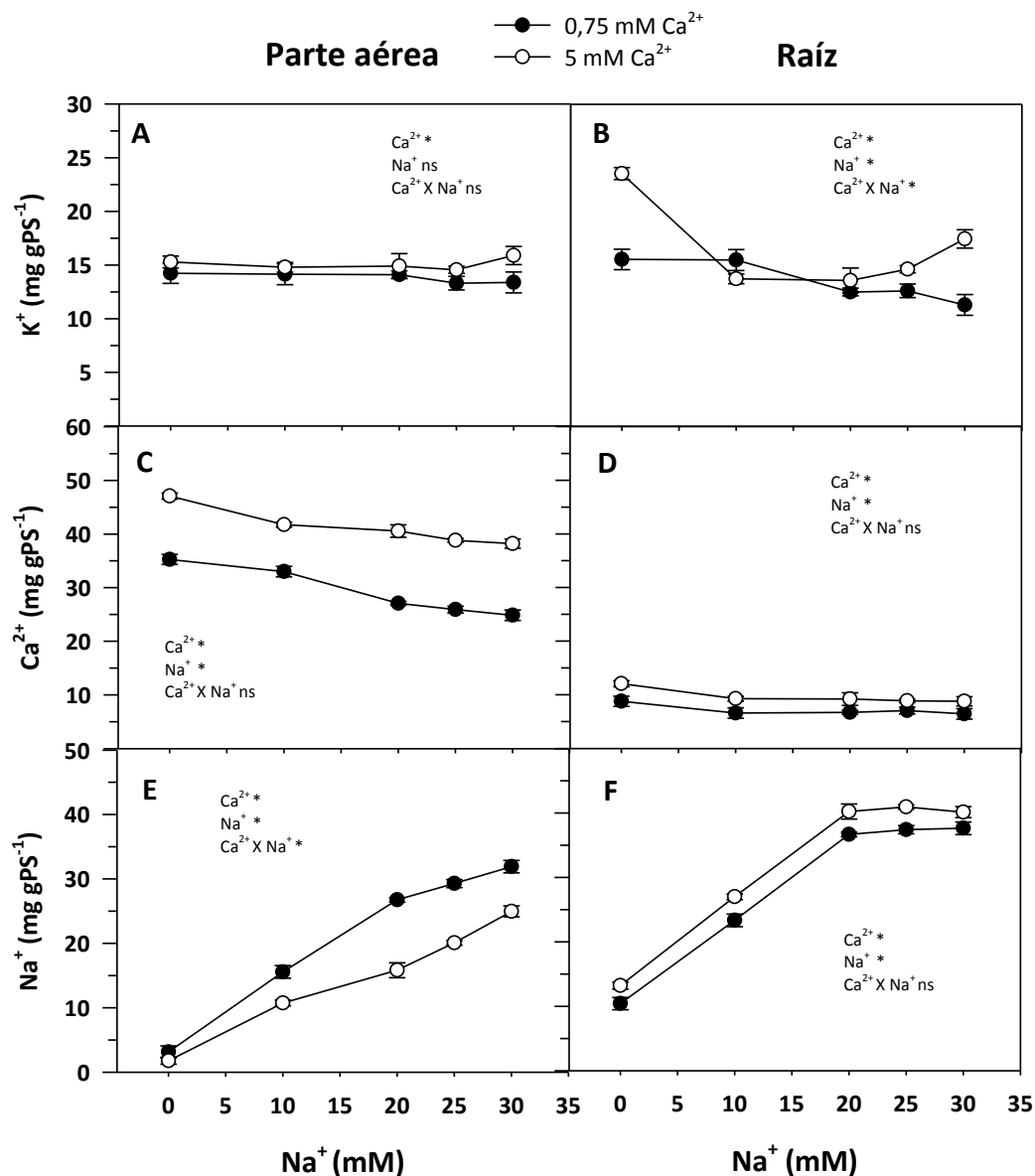


Figura 50. Concentraciones de K^+ (A y B), Ca^{2+} (C y D) y Na^+ (E y F) en parte aérea y raíz de las plantas sometidas a los distintos tratamientos. Se muestra la media de tres experimentos independientes y las barras indican el error estándar. Los asteriscos indican efecto significativo de Na^+ , Ca^{2+} o su interacción; 'ns' indica que no hay efecto significativo.

El aumento del Na^+ en la solución de crecimiento supuso un incremento en las concentraciones de dicho catión en los tejidos. El efecto de los distintos niveles de Ca^{2+} sobre las concentraciones de Na^+ fue opuesto en las distintas partes de la planta: el nivel alto de Ca^{2+} produjo una menor acumulación, de forma significativa, de las concentraciones de Na^+ en la parte aérea (Figura 50E), mientras que en la raíz la acumulación de Na^+ fue mayor (Figura 50F).

1.1.4- Respuesta del gen *SIHAK5* a la presencia de Na^+ y Ca^{2+} .

Las plantas cultivadas y sometidas a los distintos tratamientos (Tabla 46), se destinaron a la extracción de ARN de las raíces y posterior síntesis de ADNc (MyM apartados 2.2.2.1 y 2.2.2.2) para estudiar la influencia de los tratamientos sobre la respuesta transcripcional del gen *SIHAK5*. De igual forma que se ha descrito anteriormente, se analizó la expresión de *SIHAK5* mediante PCR en tiempo real, utilizando el gen *SIEF-1 α* como control interno de referencia.

Como ya se ha observado previamente, el ayuno de K^+ produce una inducción del gen *SIHAK5* (Nieves-Cordones, M. y col., 2007; Nieves-Cordones, M. y col., 2008). La presencia de Na^+ en la solución de crecimiento supuso una reducción de los niveles de *SIHAK5* de forma que a mayor concentración de Na^+ menor era la expresión, y esto ocurrió en los dos niveles de Ca^{2+} . Sin embargo, se observó que la represión del gen producida por Na^+ fue mayor en el nivel bajo de Ca^{2+} . Es decir, la presencia de un nivel alto de Ca^{2+} revirtió parcialmente la represión del gen *SIHAK5* producida por la Na^+ . Por ejemplo, se observa que la presencia de 20 mM de Na^+ redujo la expresión de *SIHAK5* en un 80 % cuando el nivel de Ca^{2+} era de 0,75 mM, mientras que a 5 mM de Ca^{2+} , la reducción fue del 50 % (Figura 51).

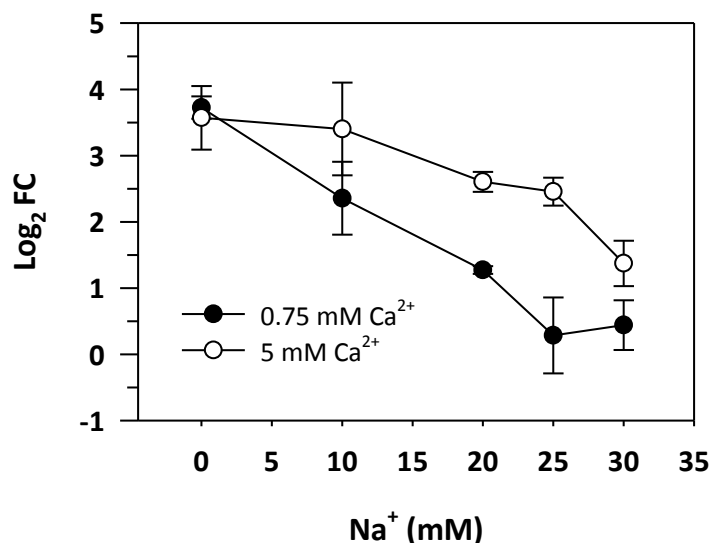


Figura 51. Niveles de expresión de *SIHAK5* en raíces de tomate tras los distintos tratamientos de Ca^{2+} y Na^+ . La expresión de *SIHAK5* se determinó por PCR en tiempo real y los niveles de expresión se muestran como el Log_2 FC en el gen *SIHAK5* respecto al control interno de referencia *SIEF-1 α* , y respecto a la muestra calibrador (muestra control en solución completa) según el método comparativo de C_T . Se representa la media de tres repeticiones. Las barras muestran diferencias significativas a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

1.1.5- Efecto de la presencia de Ca^{2+} y Na^+ sobre el potencial de membrana de las células de raíz.

En este apartado se analizó si los tratamientos de Ca^{2+} y Na^+ durante los 7 días de tratamiento que daban lugar a cambios en la absorción de K^+ y en la transcripción del gen *SIHAK5*, producían también algún efecto sobre el potencial de membrana de las células de la epidermis y del córtex de raíz. Para ello, se crecieron las plantas de tomate durante 15 días y se sometieron a las dos concentraciones de Ca^{2+} estudiadas (0,75 y 5 mM), en ausencia y presencia de 20 mM de Na^+ . Se escogió la concentración de 20 mM de Na^+ porque las plantas crecidas en dicha concentración, habían mostrado diferencias claras en la tasa de absorción de K^+ entre los dos niveles de Ca^{2+} estudiados, (Figura 46) y en la expresión de *SIHAK5* (Figura 51),

Los valores de potencial de membrana (V_m) de las células de la raíz se determinaron mediante la utilización de un microelectrodo insertado en la célula de la raíz y conectado a un electrómetro (MyM, apartado 2.1.2.2.3).

Las plantas ayunadas de K^+ y crecidas en ausencia de Na^+ presentaron un potencial de membrana de -150 mV, similar en los dos tratamientos con ambos niveles de Ca^{2+} . Cuando se crecieron en ausencia de K^+ y en presencia de 20 mM de Na^+ y un nivel bajo Ca^{2+} , el potencial de membrana se despolarizó un 25 % (-113 mV) respecto al control; mientras que en presencia de un nivel alto de Ca^{2+} esta despolarización fue significativamente menor, del 9 % (-135 mV) (Figura 52).

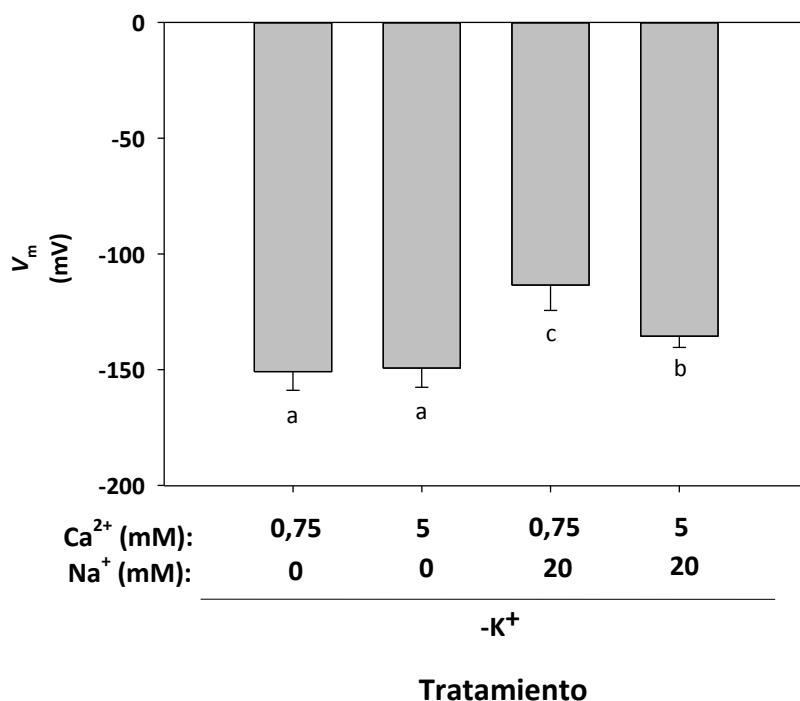


Figura 52. Potencial de membrana de las células de raíz sometidas a los distintos tratamientos de Ca^{2+} y Na^+ . Se muestra el potencial de membrana de las células de las raíces de las plantas ayunadas de K^+ en ausencia o presencia de 20 mM de Na^+ y en presencia de 0,75 mM o 5 mM de Ca^{2+} . Se muestra la media de 10 determinaciones independientes. Las barras con letras diferentes muestran diferencias significativas a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

1.2- PAPEL DEL ETILENO Y DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *SLHAK5*.

Se ha descrito en *Arabidopsis* que en condiciones de distintas deficiencias nutricionales se produce un rápido aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Shin, R. y col., 2005). Se ha propuesto que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) podría actuar como una señal en la respuesta general a una deficiencia nutricional (Shin, R. y col., 2005).

El ayuno de K^+ produce una acumulación de ROS tanto en las plantas de *Arabidopsis* (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Shin, R. y col., 2005) como en las de tomate (Hernandez, M. y col., 2012) y la inducción del gen *AtHAK5* de *Arabidopsis* parece ser dependiente de esta producción de ROS (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004). Tras el pico inicial de acumulación de ROS, aumenta la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD), de peroxidasas y de la glutatión S-transferasa (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Hernandez, M. y col., 2012). En *Arabidopsis*, se ha observado que la peroxidasa RCI3 (*'Rare Cold Inducible 3'*), estaría implicada en la respuesta a bajo K^+ , contribuyendo a la producción de ROS y modulando la expresión de *AtHAK5* (Kim, M.J. y col., 2010).

En plantas de *Arabidopsis* los niveles de etileno aumentan en respuesta al ayuno de K^+ y también se inducen enzimas implicadas en su biosíntesis (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004). La producción de ROS en plantas ayunadas de K^+ se bloquea con inhibidores de etileno, por lo que esta hormona estaría actuando aguas arriba de las ROS en la respuesta a la deficiencia de K^+ (Jung, J.Y. y col., 2009).

Con el objetivo de comprobar si el etileno y las ROS también participan en la señalización por bajo K^+ en las plantas de tomate mediante un efecto sobre la transcripción de *SIHAK5*, se realizó un experimento donde se añadieron a la solución nutritiva, compuestos químicos que afectan a estos pasos de la vía de señalización: el ion plata (Ag^+), que inhibe la acción del etileno al interferir en la función del cobre (Cu^+) como cofactor de la reacción de unión del etileno a su receptor (Beyer, E.M., 1976; Rodriguez, F.I. y col., 1999); y el difenil diodinio (DPI), que inhibe la NADPH oxidasa, implicada en la formación de H_2O_2 , mediante su unión irreversible a dicha enzima (O'donnell, V.B. y col., 1993).

Las semillas de tomate fueron tratadas y germinadas y tras su cultivo durante 15 días en solución 1/5 de Hoagland modificada (MyM apartado 1.3.1.1.1), las plantas se sometieron a los distintos tratamientos (Tabla 47).

Tabla 47. Concentraciones de K^+ , Ag^+ y DPI en las soluciones utilizadas para los distintos tratamientos.

Tratamiento	K^+ (mM)	Ag^+ (μ M)	DPI (μ M)
Control	1,4	0	0
-K	0	0	0
- K^+ +0,25 Ag^+	0	0,25	0
- K^+ +0,1 DPI	0	0	0,1

1.2.1- Efecto sobre la absorción de K^+ de alta afinidad.

Transcurridos 7 días en la solución de tratamiento, las plantas se transfirieron a recipientes individuales para determinar su capacidad para absorber el K^+ en el rango de alta afinidad en una solución 1/5 de Hoagland modificada con 50 μ M de K^+ en ausencia de los inhibidores Ag^+ y DPI. Esta capacidad se determinó mediante un ensayo de desaparición del K^+ presente en una solución externa, como se indica en MyM apartado 2.1.2.2.2. Se tomaron muestras de la solución externa de K^+ cada 15 minutos durante 5 horas y las concentraciones de K^+ de cada muestra se determinaron mediante EAA y se representaron frente al tiempo.

La tasa de absorción de K^+ se calculó en base a la concentración de K^+ en la solución externa por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Los tratamientos con Ag^+ y DPI durante los 7 días de ayuno de K^+ redujeron la capacidad de absorción de K^+ por las raíces de las plantas de tomate (Figura 53).

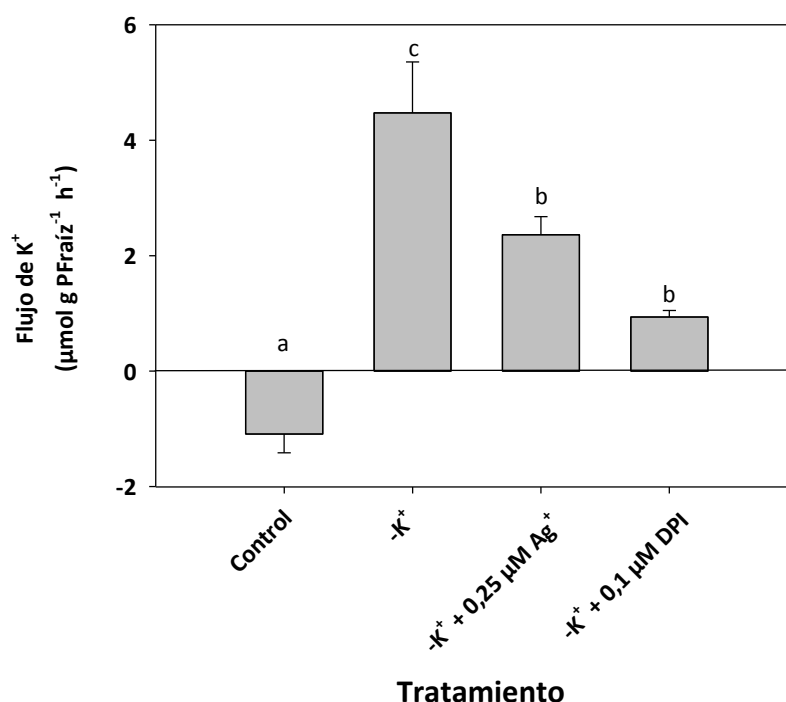


Figura 53. Tasa de absorción de K⁺ de raíces de plantas de tomate tratadas en ausencia de K⁺ y presencia de 0,25 µM de Ag⁺ o 0,1 µM de DPI. La absorción de K⁺ se determinó como el K⁺ desaparecido de la solución externa por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Se muestra la media de 3 experimentos independientes. Las barras con letras diferentes muestran valores con diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey.

1.2.2- Efecto sobre la transcripción de *SIHAK5*.

Se estudió entonces la respuesta del gen *SIHAK5* en las raíces de las plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos, mediante PCR en tiempo real. Tras el cultivo durante 15 días y 7 días en las soluciones con los tratamientos (Tabla 47), se extrajo el ARN de raíces y se sintetizó el ADNc correspondiente. De igual forma a la descrita anteriormente, se analizó la expresión de *SIHAK5* mediante PCR en tiempo real, utilizando el gen *SIEF-1α* como control interno de referencia.

La presencia tanto de Ag⁺ como de DPI en la SN sin K⁺, llevó a la disminución de los niveles de transcripción de *SIHAK5*, inducidos en condiciones de ayuno de K⁺ (Figura 54).

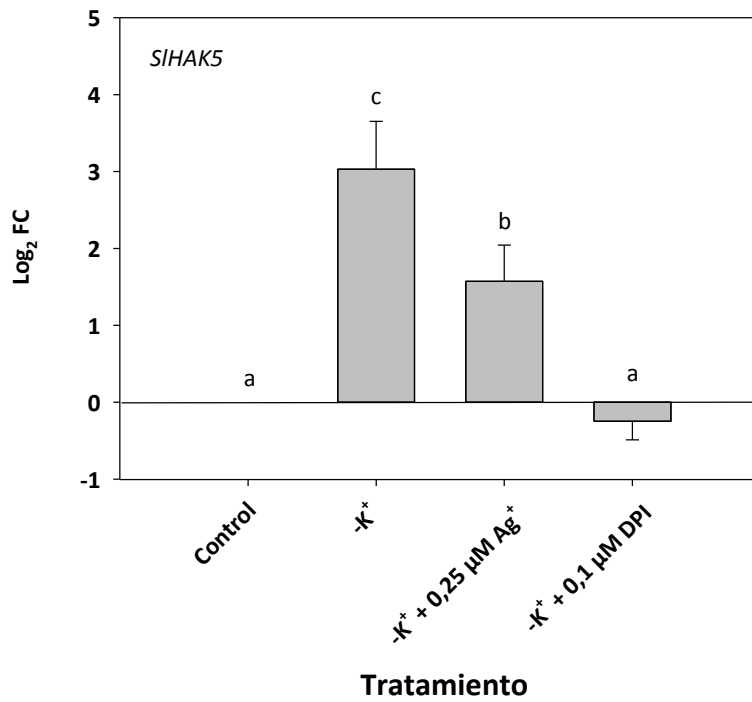


Figura 54. Efecto de la Ag⁺ y DPI en los niveles de expresión de *SIHAK5* en raíces de plantas de tomate determinados por PCR en tiempo real. Los niveles de expresión se muestran como el Log₂ FC respecto a la muestra calibrador (muestras control crecidas en solución nutritiva completa) según el método comparativo de C_T. Las barras con letras diferentes muestran valores con diferencias significativas a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

2-ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL/ POSTRADUCCIONAL DEL TRANSPORTADOR DE K⁺ DE ALTA AFINIDAD HAK5.

Los resultados recogidos en el apartado 2 del Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, muestran que la deficiencia de nutrientes como NO₃⁻ y PO₄³⁻ en la solución externa da lugar a una inducción del gen que codifica el transportador de K⁺ HAK5, tanto en plantas de tomate como en Arabidopsis. Sin embargo, la deficiencia de estos nutrientes no induce la absorción de K⁺ de alta afinidad, a menos que haya también deficiencia de K⁺. Por tanto, se podría postular que es necesaria una señal de bajo K⁺ para que el transportador HAK5 sea totalmente funcional. Se han descrito numerosos transportadores de nutrientes que están ligados a una regulación postranscripcional y/o postraducciona (Xu, J. y col., 2006; Li, L. y col., 2006; Ho, C.H. y col., 2009; Lee, S.C. y col., 2007).

En este apartado se lleva a cabo un estudio para dilucidar si el transportador AtHAK5 de Arabidopsis, podría estar sujeto a una regulación postranscripcional/postraducciona ligada a la falta de K⁺, lo que supondría un mecanismo de control de la actividad del transportador.

2.1- REGULACIÓN DE AtHAK5 POR EL COMPLEJO CIPK/CBL.

Ante los indicios mencionados anteriormente, cabía preguntarse qué tipo de mecanismo podía estar implicado en esta regulación postranscripcional y/o postraducciona de AtHAK5. Se ha descrito que el canal AKT1 está regulado mediante fosforilación a través del complejo AtCIPK23/AtCBL1 (Xu y col., 2006; Li y col., 2007). En uno de estos estudios, (Xu, J. y col., 2006) propusieron que el complejo constituido por AtCIPK23/AtCBL1 -o AtCBL9 no parecía regular únicamente la activación del canal AKT1, puesto que el mutante *cipk23* presentaba menor concentración de K⁺ en la parte aérea que el mutante *akt1*. Teniendo en cuenta que AKT1 y HAK5 son los dos principales sistemas que median la absorción de K⁺ en Arabidopsis (Rubio, F. y col., 2010; Pyo, Y.J. y col., 2010), se consideró que este complejo AtCIPK23/AtCBL1 podría ser también responsable de la regulación postranscripcional del transportador HAK5.

El trabajo descrito en este apartado se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Francisco Javier Quintero Toscano y el Dr. José Manuel Pardo Prieto, del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF-CSIC), en Sevilla, España. Algunos experimentos realizados por este grupo se han incorporado a esta memoria pues resultan imprescindibles

para la interpretación de los resultados. En tales casos, la autoría se especifica en el pie de la figura correspondiente.

2.1.1- Implicación del complejo AtCIPK23/AtCBL1 en la regulación de AtHAK5.

2.1.1.1- Coexpresión en levadura de AtHAK5 y AtCIPK23/AtCBL1.

Los resultados previos de complementación funcional en levadura (Rubio, F. y col., 2000) muestran que la expresión de AtHAK5 en una cepa WΔ3 de *S. cerevisiae*, deficiente en los sistemas endógenos de transporte de K⁺, no resulta en crecimiento en condiciones de bajo K⁺, aunque si se podía detectar entrada de K⁺ (Rb⁺) de alta afinidad mediada por AtHAK5 con una baja V_{max}. Que la complementación en levadura con HAK5 no fuera completa podría deberse a la falta de activación por otras proteínas presentes en la planta y ausentes en la levadura. Dichas proteínas podrían ser CIPK23 y CBL1.

Para comprobar la activación de AtHAK5 por AtCIPK23 y AtCBL1 en levadura se utilizaron las construcciones que se describen a continuación. El ADNc de AtHAK5 se clonó en el vector pRS425 bajo el promotor del gen PMA1 (*'Plasma Membrane AtPase 1'*), el de AtCIPK23 en p414GPD bajo el promotor del gen GPD (*'Glucose-6-Phosphate 1-Dehydrogenase'*) y el de AtCBL1 en pYPGE15 bajo el control del gen PGK (*'Phosphoglycerate Kinase'*). En algunos casos, se utilizó una construcción en la que los ADNc de AtCIPK23 y AtCBL1 se clonaron juntos en el plásmido p414GPD bajo el control del promotor del gen GPD y del gen PGK, respectivamente. En estos casos, se utilizó una construcción en la que el ADNc de AtHAK5 se clonó en el plásmido pDR195 bajo el control del promotor del gen PMA1. Estas construcciones se transformaron en la cepa de levadura 9.3 indicándose en cada caso en concreto si se utilizaban las construcciones con AtCIPK23 y AtCBL1 por separado (que se indica con AtCIPK23 + AtCBL1) o juntos (que se indica como AtCIPK23/AtCBL1). (Recogidos en el Anexo 3).

Se llevó a cabo un ensayo de complementación en levadura, que consistió en el crecimiento de los distintos transformantes en medio sólido PA (MyM apartado 2.1.2.3.1) para lo cual, se crecieron durante toda la noche en medio YPD suplementado con 100 mM de KCl hasta saturación. A partir de estos cultivos se obtuvieron suspensiones de levadura en agua con una DO₆₀₀ de 1 y diluciones decimales seriadas que se sembraron en medio PA (MyM apartado 1.2.2) con distintas concentraciones de K⁺.

Como se observa en la Figura 55, únicamente la coexpresión de las tres proteínas juntas dio lugar al crecimiento de la levadura en condiciones de bajo K^+ . Ninguna otra combinación de proteínas dio este resultado, lo que demuestra que el complejo AtCIPK23/AtCBL1 sería el responsable de la activación de HAK5, sin serlo ninguna de las dos proteínas individualmente.

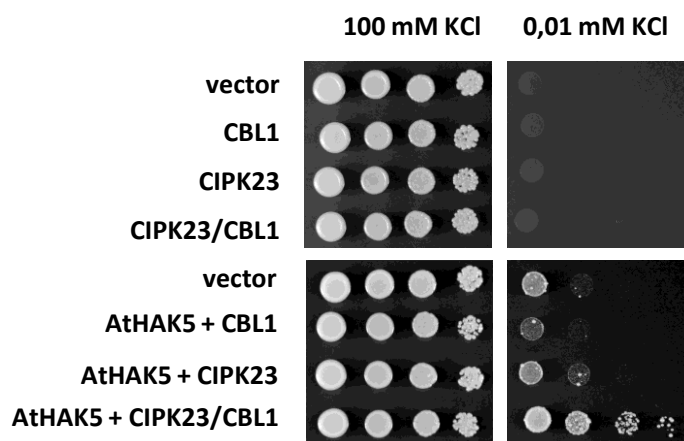


Figura 55. Ensayo de complementación de AtHAK5 en levadura en medio PA con distintas concentraciones de K^+ . Se muestra el crecimiento de la cepa 9.3 (*trk1*, *trk2*) transformada con el plásmido pRS425 vacío (vector) o con el ADNc de AtHAK5 (AtHAK5), coexpresados con la proteína AtCBL1 (+ CBL1), la proteína AtCIPK23 (+ CIPK23), y las dos proteínas juntas (+ CIPK23/CBL1), en medio PA suplementado con una concentración alta (100 mM) y baja (0,01 mM) de K^+ . Se muestran 4 diluciones decimales seriadas de una suspensión de células de DO_{600} igual a 1.

Una vez comprobado que la coexpresión de AtCIPK23 y AtCBL1 es necesaria para el funcionamiento de AtHAK5 en condiciones de bajo K^+ , se procedió a caracterizar dicha activación. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de absorción de Rb^+ en las levaduras que expresaban las proteínas (MyM, apartado 2.1.2.3.2). Las distintas cepas de levadura se crecieron toda la noche a 28 °C en medio mínimo PA con K^+ suficiente (3 mM KCl), y posteriormente se sometieron a ayuno de K^+ durante 6 horas en medio PA sin K^+ añadido. Una vez transcurrido este tiempo, se recogieron las células por centrifugación y se expusieron a distintas concentraciones externas de Rb^+ en el rango de 0 a 100 μ M en tampón de transporte. Se tomaron muestras de las suspensiones de levadura a distintos tiempos, se recogieron las células por filtración y se sometieron a extracción ácida. Las concentraciones internas de Rb^+ para cada cepa se determinaron mediante EEA y se calcularon las velocidades de absorción de Rb^+ para cada concentración externa del mismo respecto al peso seco de las células. Los datos de velocidad de absorción de Rb^+ se representaron frente a la concentración externa de Rb^+ . Los datos se ajustaron a cinéticas de Michaelis-Menten (Figura 56).

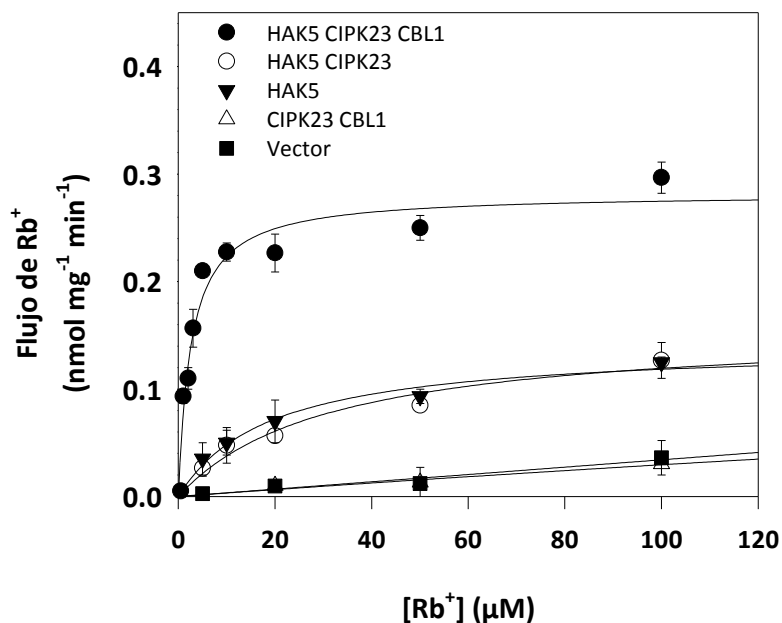


Figura 56. Tasas de absorción de Rb⁺ en células de levadura que expresan AtHAK5, AtCIPK23 y AtCBL1. Las células de la cepa 9.3 transformadas con el plásmido vacío (cuadrados negros), AtHAK5 (triángulos negros), el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (triángulos blancos), AtHAK5 con AtCIPK23 (círculos blancos), y AtHAK5 con AtCIPK23/AtCBL1 (círculos negros), se sometieron a un ensayo de absorción de Rb⁺ donde se determinó la velocidad de absorción de Rb⁺, y se calcularon los valores de V_{max} y K_m . Se representa la media de 3 repeticiones. Las barras de error indican errores estándar.

Las células control que expresaban el vector vacío no dieron lugar a absorción de Rb⁺ como cabría esperar debido a la carencia de sistemas de absorción de K⁺ de alta afinidad en la levadura 9.3. De igual forma, la expresión del complejo AtCIPK23/AtCBL1 no resultó en absorción de Rb⁺, lo que indica que ningún sistema de transporte de K⁺ endógeno se activaría por la expresión de este complejo. Cuando las células expresaron AtHAK5, se produjo un incremento en la absorción de Rb⁺ que mostró una cinética de saturación, de acuerdo con una absorción de K⁺ mediada por AtHAK5, que es similar a la cinética mostrada por las células que coexpresan AtHAK5 con AtCIPK23. Sin embargo, cuando las células expresaban AtHAK5 junto con el complejo AtCIPK23/ATCBL1, se produjo un incremento considerable de las velocidades de absorción de Rb⁺ (Figura 56).

El análisis cinético de las velocidades de absorción de cada cepa mostró que la afinidad por el Rb⁺ de AtHAK5 solo o de AtHAK5 coexpresado con AtCIPK23 no era significativamente distinta, como reflejan los valores de K_m de $19,3 \pm 4,5$ y $31,9 \pm 11,7$ µM de Rb⁺, respectivamente. Mientras que la coexpresión de AtHAK5 con AtCIPK23 y AtCBL1 redujo de manera significativa la K_m a $2,6 \pm 0,6$ µM. Además, la velocidad máxima de absorción fue

significativamente mayor en las células que coexpresaron AtHAK5 con el complejo AtCIPK23/AtCBL1, con un valor de $0,28 \pm 0,6 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ comparado con el $0,14 \pm 0,01$ y el $0,16 \pm 0,02$ para AtHAK5 y para AtHAK5 junto con AtCIPK23, respectivamente. Estos datos sugieren que la mejora en el crecimiento a bajo K^+ de las células que expresan AtHAK5, AtCIPK23 y AtCBL1 se debe a que el complejo AtCIPK23/AtCBL1 estaría regulando la actividad de HAK5 mediante la modificación de sus propiedades cinéticas, dando lugar a un transportador con mayor afinidad por el K^+ y con mayor velocidad máxima.

2.1.1.2- Regulación de AtHAK5 por AtCIPK23.

Con el fin de profundizar en el tipo de regulación que ejerce AtCIPK23 sobre AtHAK5, se utilizaron dos mutantes de AtCIPK23. El alelo AtCIPK23 (T190D, Δ 331) combina una mutación en su actividad quinasa con la delección del dominio C-terminal a partir del residuo 331, eliminándose su dominio auto-inhibitorio (Chaves-Sanjuan, A. y col., 2014). Por tanto, estas dos mutaciones originan una proteína AtCIPK23 hiperactiva en su función quinasa, de forma independiente a su interacción con AtCBL1. El segundo alelo utilizado, CIPK23 (K60N), tiene sustituida la lisina (K) de la posición 60 por ácido aspártico (D), que por ser el sitio catalítico necesario para la transferencia del grupo fosfato, esta mutación da lugar a una quinasa inactiva (Li, L. y col., 2006).

De forma similar al ensayo de crecimiento en medio sólido ya realizado, se realizó un ensayo de complementación en levadura donde las células expresaban AtCIPK23 (T190D, Δ 331) con su ADNc clonado en el vector p414GPD, o AtCIPK23 (K60N)-clonado en p414GPD-junto con AtCBL1-clonado en pYPGE15, en presencia o ausencia de AtHAK5, clonado en pRS425 (Recogidos en el Anexo 3).

En la Figura 57 se muestra el crecimiento de los distintos transformantes en un medio de K^+ suficiente y en medio con bajo K^+ . Ninguno de los mutantes de AtCIPK23 dio lugar a una mejora del crecimiento a bajo K^+ en presencia de AtHAK5, en comparación con la proteína AtCIPK23 silvestre. Esto significa, que la regulación de AtHAK5 por AtCIPK23 requiere tanto su actividad quinasa como la interacción física del dominio C-terminal de forma simultánea, sin ser ninguna de estas dos funciones predominante frente a la otra.

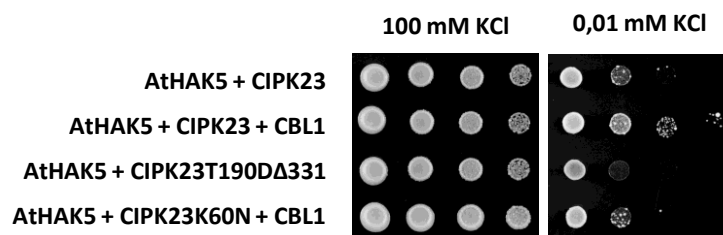


Figura 57. Ensayo de complementación de AtHAK5 en levadura en medio PA con distintas concentraciones de K⁺. Se muestra el crecimiento de la cepa 9.3 (*trk1*, *trk2*) transformada con el ADNc de AtHAK5, coexpresado con la proteína AtCIPK23 (+CIPK23), y las dos proteínas (+CIPK23 + CBL1), el alelo mutante AtCIPK23 T190D Δ331 (+CIPK23T190DΔ331) y el alelo AtCIPK23 K60D con CBL1 (+CIPK23K60D + CBL1), en medio PA suplementado con una concentración alta (100 mM) y baja (0,01 mM) de K⁺. Se muestran 4 diluciones decimales seriadas de una suspensión de células de DO₆₀₀ igual a 1. Ensayo realizado por el grupo del Dr. Quintero (IBVF-CSIC), en Sevilla.

Para comprobar si la proteína AtCIPK23 estaría regulando a AtHAK5 mediante fosforilación, se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* con distintos fragmentos de AtHAK5. Para aislar dichos fragmentos, se obtuvieron construcciones de ADN correspondientes a estos fragmentos fusionados al correspondiente ADN de la proteína glutatión S-transferasa (GST). En concreto, se llevaron a cabo fusiones de GST con tres regiones citosólicas de AtHAK5: el dominio N-terminal de AtHAK5 (aminoácidos del 1 al 95); un bucle comprendido entre los segmentos transmembrana 2 y 3 (aminoácidos del 123 al 182), que se denominó 'Internal loop' (IL); y el dominio C-terminal (aminoácidos del 530 al 784). Estas fusiones con GST se expresaron en *E. coli* y se purificaron como se indica en MyM, apartado 2.3.4.

Para llevar a cabo este ensayo, se utilizó el alelo AtCIPK23 (T190D, Δ331), debido a que posee una actividad quinasa mayor que AtCIPK23 WT e independiente de AtCBL1 (Chaves-Sanjuan, A. y col., 2014). Como se observa en la Figura 58, se da una señal de fosforilación únicamente en la reacción en la que están presentes la proteína AtCIPK23 y el dominio N-terminal de AtHAK5.

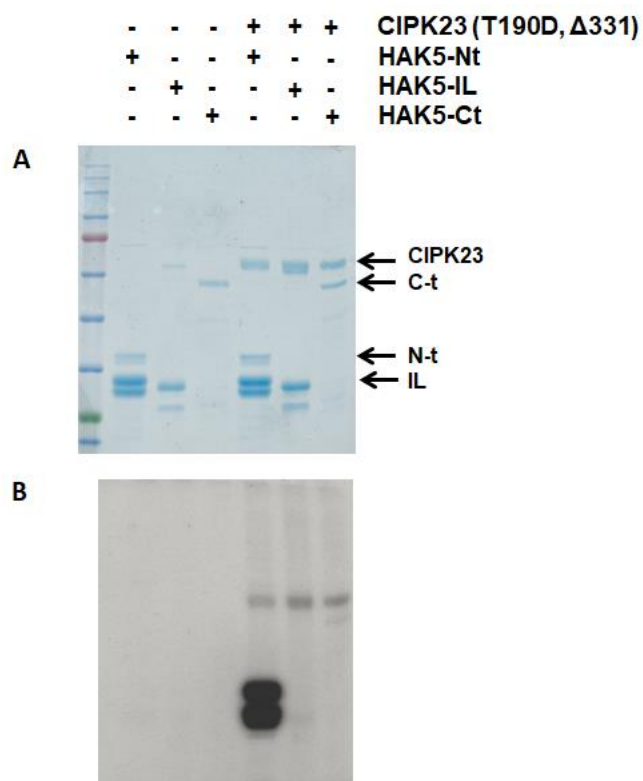


Figura 58. Ensayo de fosforilación *in vitro* de AtHAK5. Las fusiones de GST con distintas regiones de HAK5 (C-t, C-terminal; N-t, N-terminal; e IL, 'Internal Loop'), se sometieron a fosforilación mediante la acción de la quinasa AtCIPK23 (T190D, Δ331) y los resultados se resolvieron en gel SDS-PAGE. A, proteínas del ensayo mostradas mediante la tinción con Azul Coomassie en el gel SDS-PAGE. B, Autoradiografía que muestra la incorporación de ^{32}P a la región N-terminal de HAK5. Ensayo realizado por el grupo del Dr. Quintero (IBVF-CSIC), en Sevilla.

2.1.1.3- Papel de AtCIPK23 en la absorción de K^+ en planta.

Demostrada la activación de AtHAK5 por el complejo AtCIPK23/AtCBL1 en levadura, se diseñaron experimentos para demostrar el papel del complejo AtCIPK23/AtCBL1 en la regulación del transportador AtHAK5 en la planta. Para ello, se utilizaron mutantes de inserción de T-ADN que anulaban la función de AtHAK5, AKT1 y AtCIPK23 (Pyo, Y.J. y col., 2010; Rubio, F. y col., 2008). También se generaron los mutantes dobles *hak5 cipk23*, *akt1 cipk23* y el mutante triple *hak5 akt1 cipk23* (Anexo 4). Con estas líneas mutantes se llevaron a cabo ensayos de absorción de Rb^+ y de crecimiento a distintas concentraciones de K^+ , de forma que se pudiese estudiar el efecto de las mutaciones de pérdida de función sobre los genes implicados en la absorción de K^+ .

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de absorción de Rb^+ desde una solución externa con 50 μM (MyM, apartado 2.1.2.1.2). Las plantas de los distintos genotipos se crecieron durante 30 días en condiciones de K^+ suficientes (1,4 mM KCl) y posteriormente se

sometieron a 7 días de ayuno de K^+ . El ensayo consistió en exponer las plantas a una solución de $50 \mu M$ de Rb^+ durante 7 horas, e ir tomando muestras de la solución externa cada hora. Se determinaron las concentraciones de Rb^+ presentes en cada muestra mediante EAA, y se calculó la tasa de absorción de Rb^+ en función de la desaparición de Rb^+ de la solución externa por gramo de peso seco de raíz por hora.

Como se puede observar en la Figura 59, la absorción llevada a cabo por mutante *hak5-3* fue el 72 % de la de WT. Esto significa que a la concentración ensayada ($50 \mu M$), el transportador AtHAK5 media al menos un tercio del total de la absorción. Por otra parte, la pérdida de función del gen AKT1 no conllevó una disminución de la absorción, mientras que la absorción de Rb^+ en el doble mutante *hak5 akt1* fue prácticamente nula. Por tanto, la actividad de AtHAK5 a esta concentración compensa totalmente la ausencia de AKT1, pero a la inversa, la compensación es solamente parcial. Estos datos concuerdan con resultados previos que afirman que estos dos transportadores son los que contribuyen en mayor medida a la absorción de K^+ y que trabajan de manera conjunta en el rango de concentraciones de 10 a $50 \mu M$ (Rubio, F. y col., 2008; Rubio, F. y col., 2010).

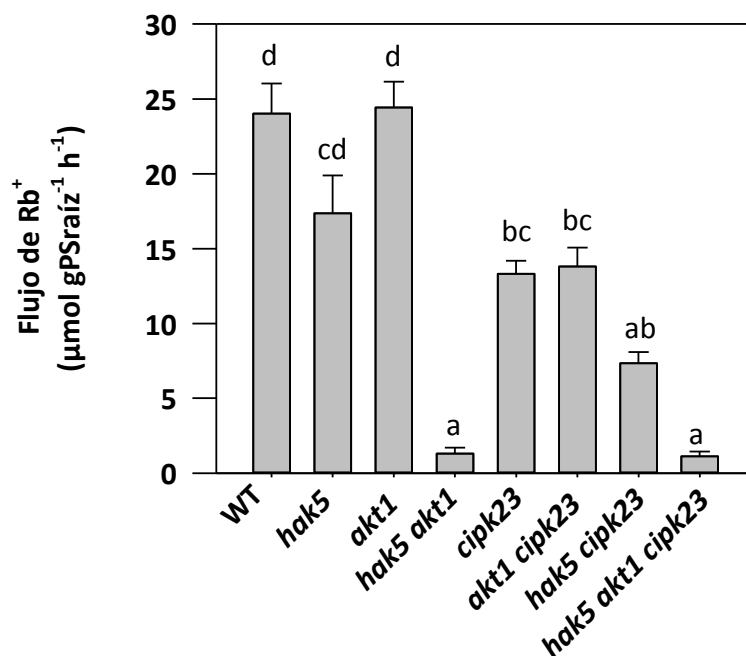


Figura 59. Tasa de absorción de Rb^+ por raíces de las líneas de Arabidopsis, línea silvestre (WT), y mutantes en los genes HAK5, AKT1 y CIPK23. Las plantas de 30 días de edad y ayunadas de K^+ durante 7 días, se sometieron a un ensayo de desaparición de Rb^+ del medio externo ($50 \mu M$), durante 7 h. Se calculó la tasa de absorción de Rb^+ por gramo de peso seco de raíz por hora por las raíces de cada línea.

Se muestra la media de 6 repeticiones y las barras con diferentes letras muestran valores significativamente diferentes a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

En este ensayo, la línea mutante *cipk23-5* mostró un 55 % de absorción de Rb^+ con respecto al WT, lo que indica que AtCIPK23 estaría implicada en la regulación de la absorción de K^+ de alta afinidad. La absorción llevada a cabo por los mutantes dobles *hak5-3 cipk23-5* y *akt1-2 cipk23-5*, reveló que la regulación de estos transportadores por AtCIPK23 supone una contribución del 43 % en la absorción mediada por AtHAK5 y del 57 %, en la mediada por AKT1.

El triple mutante *hak5-3 akt1-2 cipk23-5* no mostró absorción de K^+ de alta afinidad, al igual que el doble mutante *hak5-3 akt1-2*.

2.1.1.4- Análisis del papel de AtCIPK23 sobre el crecimiento de las plantas a bajo K^+ .

Para determinar el efecto de la ausencia de la proteína AtCIPK23 sobre el crecimiento de plantas de Arabidopsis a distintas concentraciones de K^+ , se sembraron las semillas de las líneas mutantes directamente en soluciones nutritivas que contenían 10 mM, 1,4 mM, 0,5 mM, 0,1 mM y 0,01 mM de KCl. Las distintas líneas se cultivaron durante 30 días en dichos medios, que se renovaban cada 7 días para asegurar que se mantenían las concentraciones de K^+ indicadas (Figura 60). Tras ese periodo de tiempo, las plantas se cosecharon separando la raíz de la parte aérea y se determinaron los pesos frescos, los pesos secos (tras 2 días a 65 °C) y las concentraciones de K^+ en los tejidos. (MyM, apartado 2.1.1.1.1.1).

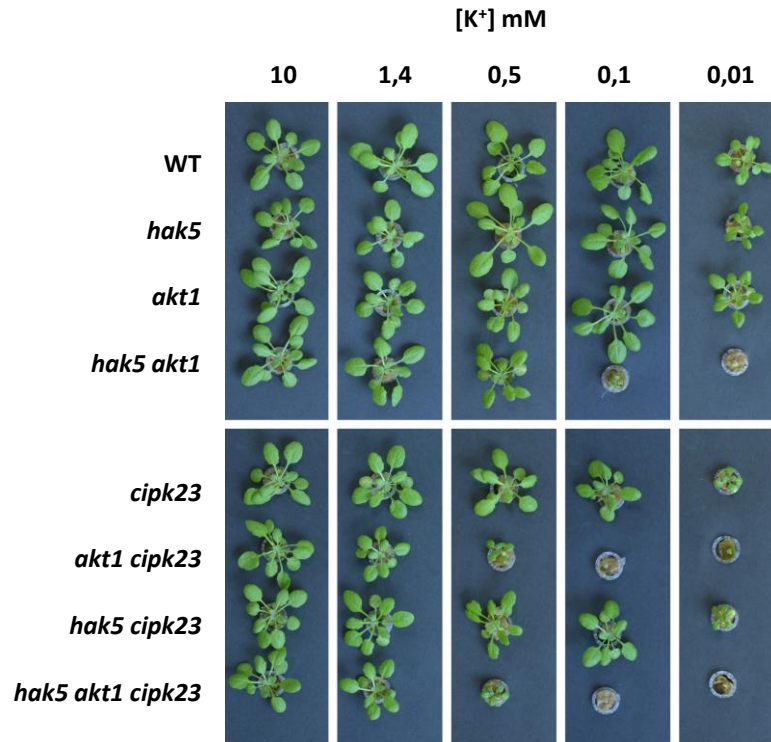


Figura 60. Plantas de Arabidopsis, línea silvestre (WT), y mutantes en los genes HAK5, AKT1 y CIPK23 crecidas en un rango de concentraciones de K⁺. Se muestra la parte aérea de las plantas crecidas durante 30 días en SN con distintas concentraciones de K⁺.

Como se deduce de la apreciación visual del tamaño de las plantas en la fotografía (Figura 60) a 10 mM de K⁺ el tamaño de todas fue similar. A 1,4 mM, el doble mutante *akt1-2 cipk23-5* y el triple mutante *hak5-3 akt1-2 cipk23-5* mostraron un menor tamaño respecto al resto, como cabría esperar por ser AKT1 el sistema que más contribuye a la absorción de K⁺ a esa concentración y ser AtCIPK23 responsable de su activación. A 0,5 mM de K⁺, la ausencia de las proteínas AKT1 y AtCIPK23 de forma individual, no produjo un efecto importante en el tamaño, mientras que los mutantes que carecen de ambas proteínas (*akt1-2 cipk23-5* y *hak5-3 akt1-2 cipk23-5*) se vieron muy afectados. La línea *hak5-3 akt1-2* mostró un mayor crecimiento a esta concentración respecto a los mutantes mencionados. Esto indica que podría existir un sistema de absorción de K⁺ operando a 0,5 mM de K⁺, distinto de AtHAK5 y AKT1, que también sería regulado por AtCIPK23.

A la menor concentración estudiada, 10 μM de K⁺, la línea *hak5-3* presentó un menor crecimiento que *akt1-2* y WT, lo que demuestra el papel que juega HAK5 en la entrada de K⁺ de alta afinidad, especialmente a concentraciones iguales o inferiores a 10 μM K⁺. Los mutantes *cipk23-5* y *hak5-3 cipk23-5* presentaron un crecimiento muy limitado, y el resto de líneas apenas crecieron.

2.1.2- Implicación del complejo AtCIPK23/AtCBL1 en la regulación de homólogos de HAK5 en especies distintas de Arabidopsis en células de levadura.

Se consideró oportuno estudiar si el complejo CIPK23/CBL1 podría participar, de igual forma que en Arabidopsis, en la activación de transportadores HAK5 de otras especies de plantas como tomate (*Solanum lycopersicum*; SIHAK5; (Nieves-Cordones, M. y col., 2007); pimiento (*Capsicum annum*; CaHAK1; (Martínez-Cordero, M.A. y col., 2004)) y *Eutrema salsuginea* (EsHAK5; (Alemán, F. y col., 2009a). Debido a que el transportador SIHAK5 no promueve el crecimiento de la levadura a bajo K^+ , para llevar a cabo este ensayo se utilizó la quimera denominada SIHAK5q, constituida por una versión de SIHAK5 que contiene 15 aminoácidos de CaHAK1 en el extremo N-terminal de la proteína recombinante, y permite el crecimiento de la levadura a 0,1 mM de K^+ (Nieves-Cordones, M. y col., 2008).

Los ADNc de los transportadores fueron clonados en el vector de expresión pDR195 y se utilizó el complejo AtCIPK23/AtCBL1 clonado en el vector p414GPD. De igual forma que para AtHAK5, se analizó el crecimiento de las células de levadura 9.3 transformadas con los distintos transportadores, tanto en presencia como en ausencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1, en medio PA con distintas concentraciones de K^+ (Figura 61). Ninguna de las células que expresaban únicamente los transportadores creció a 10 μ M de K^+ . Las células que coexpresaban CaHAK1 y SIHAK5q con el complejo AtCIPK23/ATCBL1 crecieron a bajo K^+ .

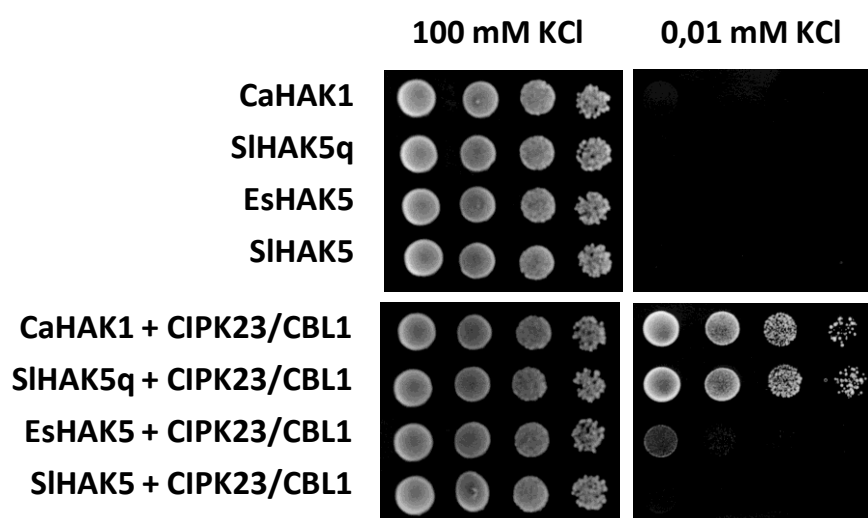


Figura 61. Ensayo de complementación de homólogos de HAK5 en levadura en medio PA con distintas concentraciones de K^+ . Se muestra el crecimiento de la cepa 9.3 (*trk1*, *trk2*) transformada con el ADNc del complejo AtCIPK23/AtCBL1 (+ CIPK23/CBL1), o el plásmido p414GPD vacío, coexpresados con el homólogo de AtHAK5 en pimiento, CaHAK1 (CaHAK1), de tomate, SIHAK5 (SIHAK5), de *E. salsuginea*

Resultados y Discusión: Capítulo 2

(EsHAK5), y con la quimera de SIHAK5 y CaHAK1 (SIHAK5q) en medio PA suplementado con una concentración alta (100 mM) y baja (0,01 mM) de K^+ . Se muestran 4 diluciones seriadas de una suspensión de células de DO_{600} igual a 1.

En menor medida crecieron las células que expresaban EsHAK5 con el complejo AtCIPK23/AtCBL1. Sin embargo, las células que coexpresaban SIHAK5 y AtCIPK23/AtCBL1 no crecieron a 10 μM de K^+ . Estos resultados sugieren que la activación de los transportadores HAK5 por complejos CIPK/CBL podría estar conservada en las distintas especies vegetales.

2.1.3.- Regulación de AtHAK5 por otros miembros de las familias CIPK y CBL.

Se ha identificado 10 CBLs y 26 CIPKs en Arabidopsis (Kolukisaoglu, U. y col., 2004), así como numerosas CBLs y CIPKs en otras especies: 10 CBLs y 31 CIPKs en arroz (*Oryza sativa*) (Albrecht, V. y col., 2001; Piao, H.L. y col., 2010), 10 CBLs y 27 CIPKs en *Populus trichocarpa* (Zhang, H.C. y col., 2008), 8 CBLs y 43 CIPKs en maíz (*Zea mays*) (Chen, X.F. y col., 2011), 8 CBLs y 21 CIPKs en uva (*Vitis vinifera*) y 6 CBLs y 32 CIPKs en *Shorgum bicolor* (Weinl, S. y Kudla, J., 2009a)

El complejo CIPK-CBL se ha implicado en la percepción y señalización de numerosos estreses, como la señalización por bajo K^+ , salinidad, estrés osmótico, y muchos otros (Batistic, O. y Kudla, J., 2004; Luan, S., 2009; Li, L. y col., 2006).

En cuanto a la señalización del estrés por falta de K^+ , se ha mostrado que los complejos AtCIPK23/AtCBL1 y AtCIPK23/AtCBL9 activan directamente al canal AKT1 localizado en la membrana plasmática, mejorando la absorción de K^+ en situaciones de estrés por bajo K^+ (Xu, J. y col., 2006; Lee, S.C. y col., 2007). También la quinasa AtCIPK9 puede interactuar con AtCBL3 y regular AKT1 en la homeostasis del K^+ (Liu, L.L. y col., 2013) y de igual forma, AtCIPK6 y AtCIPK16 activan AKT1 mediante su interacción con distintas CBLs (Luan, S., 2009; Lee, S.C. y col., 2007). Por otra parte, el complejo AtCIPK6/AtCBL4 media la translocación del canal AKT2 desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática (Held, K. y col., 2011).

Teniendo en cuenta la diversidad de interacciones entre las CBLs y CIPKs existentes para regular distintos sistemas implicados en la señalización por bajo K^+ , se consideró interesante realizar un estudio con el fin de identificar si otras proteínas AtCBLs distintas a AtCBL1 podrían activar el transporte de K^+ a través de AtHAK5 junto con la quinasa AtCIPK23; al mismo tiempo

se estudió si otras AtCIPKs podrían actuar con AtCBL1 para llevar a cabo la misma activación del transportador AtHAK5 en condiciones de bajo K^+ .

2.1.3.1- Regulación de AtHAK5 por distintas AtCBLs.

Como ya se ha comentado, la quinasa AtCIPK23 puede interaccionar tanto con AtCBL1 como con AtCBL9, y el complejo formado incrementa la actividad del canal AKT1 cuando se expresa en ovocitos de *Xenopus laevis* (Xu, J. y col., 2006; Liu, L.L. y col., 2013). Sin embargo, existe discrepancia entre varios autores, puesto que Xu, J. y col., (2006) observaron que únicamente los complejos AtCIPK23/AtCBL1 y AtCIPK23/AtCBL9 eran capaces de regular la función de AKT1, mientras que Liu, L.L. y col., (2013) vieron que los AtCIPK23/AtCBL2 y AtCIPK23/AtCBL3 también activan al canal AKT1.

Para comprobar la especificidad de las proteínas AtCBL en la regulación del transportador AtHAK5, los distintos miembros de la familia CBL de Arabidopsis se clonaron en el vector pYPGE15, se transformaron en la cepa de levadura 9.3, se coexpresaron con AtCIPK23 (clonado en el vector p414GPD) y AtHAK5 (clonado en el vector pDR195) y se estudio el crecimiento de las levaduras transformantes en medio sólido PA con distintas concentraciones de K^+ .

Como se muestra en la Figura 62, además de AtCBL1, las células de levadura que expresaban las proteínas AtCBL8, AtCBL9 y AtCBL10 junto con AtHAK5 y AtCIPK23, fueron capaces de crecer a bajas concentraciones de K^+ .

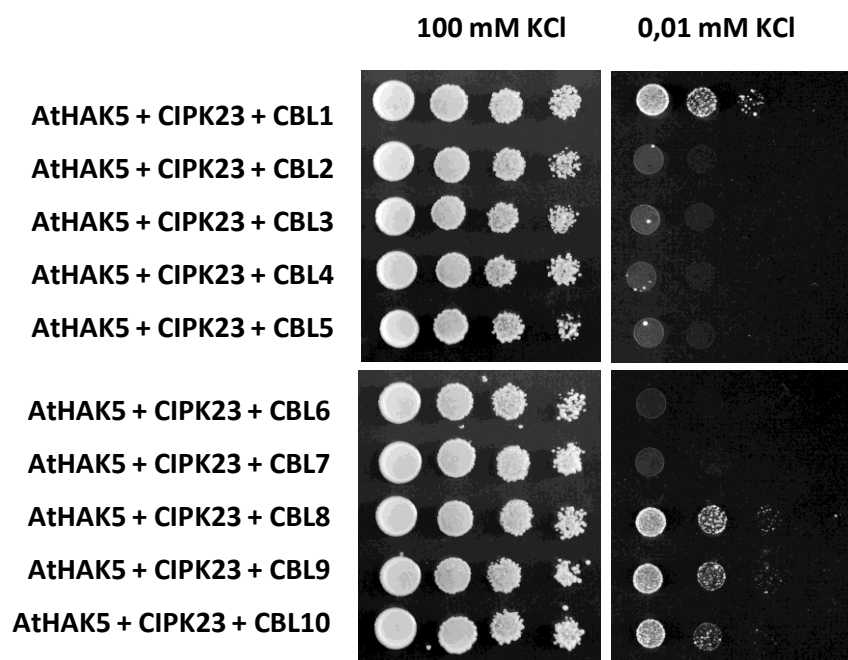


Figura 62. Caracterización funcional de los miembros de la familia CBL1 de Arabidopsis en la activación de AtHAK5 junto con la quinasa AtCIPK23 en condiciones de bajo K⁺. Las células de levadura que expresaban AtHAK5 y AtCIPK23 se transformaron y coexpresaron con las proteínas AtCBLs indicadas. Las células se crecieron y trataron como se indica en la Figura 55. Ensayo realizado por el grupo del Dr. Quintero (IBVF-CSIC), en Sevilla.

2.1.3.2- Regulación de AtHAK5 por distintas AtCIPKs

En cuanto a la señalización por bajo K⁺, se ha comentado el papel de AtCBL1 en la activación de AKT1 tras formar el complejo con AtCIPK23 (Li, L. y col., 2006; Xu, J. y col., 2006). Además, se ha visto que también participa en la regulación de AKT1 junto con AtCIPK6 (Lan, W.Z. y col., 2011).

Con el objetivo de estudiar si AtCBL1 es capaz de activar AtHAK5 junto con otras AtCIPKs distintas a AtCIPK23, las 26 CIPKs identificadas en Arabidopsis se clonaron en el vector p414GPD y se transformaron en la cepa 9.3 de levadura junto con AtHAK5 (en pDR195) y AtCBL1 (en pYPGE15). Se realizó entonces un ensayo de crecimiento en medio PA sólido, con distintas concentraciones de K⁺, donde se observa que un total de 9 AtCIPKs (AtCIPK23, AtCIPK9, AtCIPK26, AtCIPK1, AtCIPK4, AtCIPK12, AtCIPK14, AtCIPK20 Y AtCIPK10) permitían el crecimiento a bajo K⁺ cuando se coexpresaban con el transportador AtHAK5 en presencia de AtCBL1.

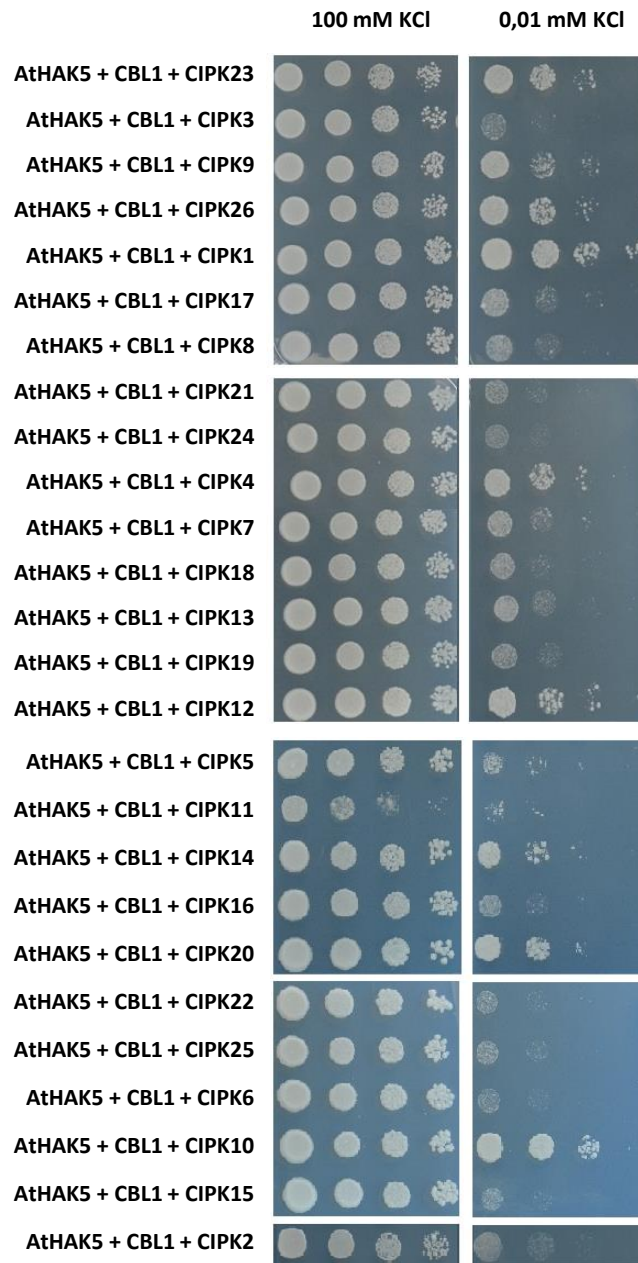


Figura 63. Caracterización funcional de los miembros de la familia AtCIPK de Arabidopsis en la activación de AtHAK5 junto con AtCBL1 en condiciones de bajo K^+ . Las células de levadura que expresaban AtHAK5 y AtCBL1 (+ CBL1) se coexpresaron con las proteínas AtCIPKs indicadas (+ CIPK). Las células se crecieron y trataron como se indica en la Figura 55. El orden de las CIPKs en la figura se dispuso siguiendo el árbol filogenético elaborado por (Mao, J.J. y col., 2016), atendiendo a su proximidad estructural con CIPK23.

2.2- PAPEL DEL DOMINIO C-TERMINAL DE AtHAK5 EN SU REGULACIÓN.

La región C-terminal parece jugar un papel importante en la regulación de los transportadores HAK/KUP/KT (Schleyer, M. y Bakker, E.P., 1993; Culham, D.E. y col., 1993; Lamark, T. y col., 1991). Se han descrito mutaciones en residuos de la región C-terminal de transportadores de la familia HAK de distintas especies que dan lugar a cambios en la velocidad máxima (Rubio, F. y col., 2000; Aleman, F. y col., 2014) o en la afinidad por el K^+ (Aleman, F. y col., 2014), sugiriendo la implicación de este dominio en la regulación y función del transportador.

Por esto, se decidió llevar a cabo un abordaje molecular que consistió en la realización de distintas deleciones del extremo C-terminal del transportador AtHAK5 (Figura 64), para conocer si este dominio podría estar implicado en la regulación postraduccional de AtHAK5, ya sea de forma dependiente o independiente de su activación por el complejo AtCIPK23/AtCBL1. La estrategia molecular para llevar a cabo las deleciones comprendió varios pasos, detallados en el Anexo 6.

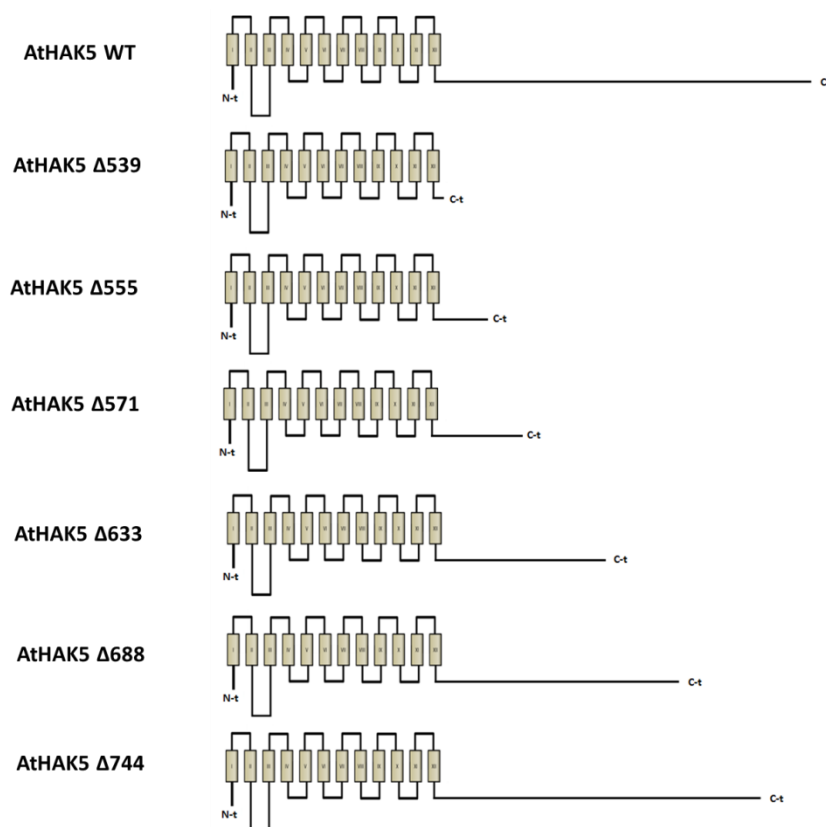


Figura 64. Esquema representativo de las construcciones realizadas del transportador AtHAK5 con distintas deleciones de su dominio C-terminal. El símbolo Δ indica 'delección' y está seguido por la localización del último aminoácido presente en la proteína truncada. 'N-t' hace referencia al dominio N-terminal; y 'C-t' al dominio C-terminal de la proteína AtHAK5.

Para conocer el efecto de las distintas deleciones en la absorción de K^+ mediada por AtHAK5, se realizó un ensayo de complementación en la cepa de levadura 9.3, en condiciones de bajo K^+ , determinando el crecimiento en medio PA (MyM, apartado 2.1.2.3.1)

Los ADNc de las construcciones de AtHAK5 que daban lugar a las distintas deleciones clonados en el vector de expresión pDR195 (plásmidos recogidos en el Anexo 3), se transformaron en la cepa 9.3 y se llevó a cabo un ensayo de complementación en levadura como se ha descrito anteriormente, en presencia y en ausencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1 (clonado en el vector p414GPD) (Figura 65).

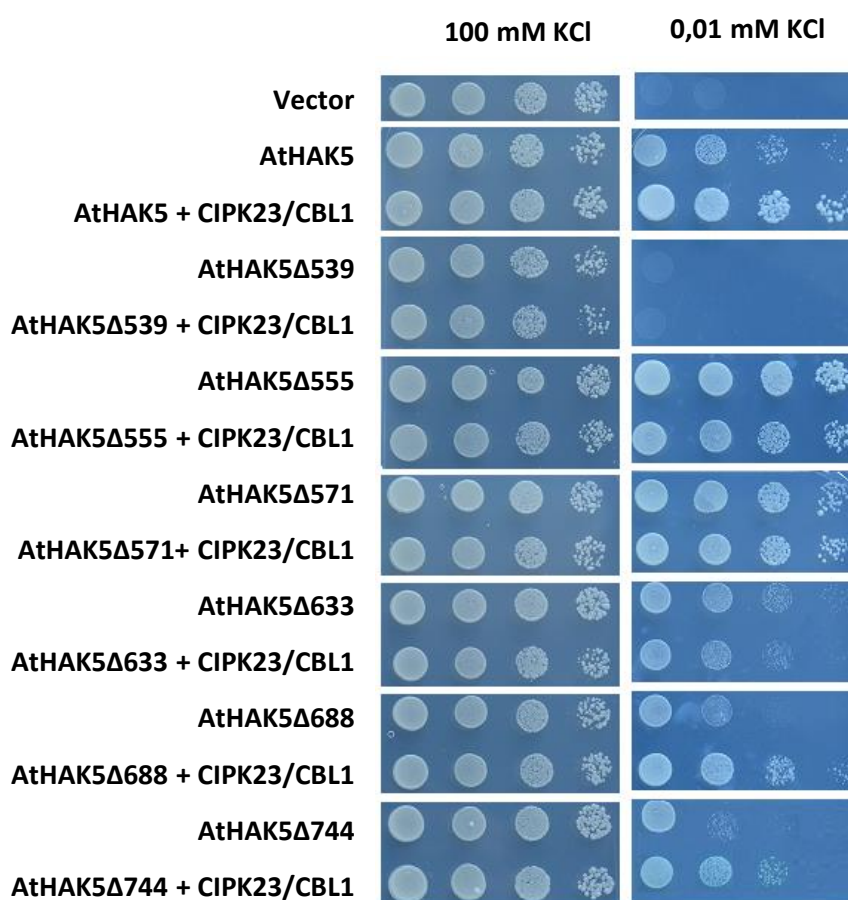


Figura 65. Caracterización funcional del transportador AtHAK5 con deleciones de su dominio C-terminal, en ausencia y presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1, en condiciones de bajo K^+ . Se muestra el crecimiento en medio PA con distintas concentraciones de K^+ (100 y 0,01 mM), de células de levadura 9.3 que expresan el plásmido vacío (vector), AtHAK5 silvestre (AtHAK5) y los mutantes AtHAK5 con las distintas deleciones, en ausencia o cotransformadas con el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (+ CIPK23/CBL1).

Resultados y Discusión: Capítulo 2

Todas las cepas presentaron un buen crecimiento en el medio control con K^+ suficiente (50 mM). La delección del dominio C-terminal a partir de aminoácido 539 (AtHAK5 Δ 539) dio lugar a un transportador AtHAK5 que no era funcional en la adquisición de K^+ , tanto en ausencia como en presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1. El transportador AtHAK5 con la delección a partir del residuo 555, complementó la cepa 9.3, creciendo bien a baja concentración de K^+ y de forma independiente a la presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1. Lo mismo ocurrió con la delección a partir del aminoácido 571. La delección a partir del residuo 633, dio lugar a una menor actividad del transportador a baja concentración de K^+ , que no se activaba por AtCIPK23/AtCBL1. Los transportadores AtHAK5 con las delecciones a partir de los residuos 688 y 744 mostraron activación de nuevo por AtCIPK23/AtCBL1, aunque presentaron una menor actividad que el transportador AtHAK5 silvestre en la adquisición de K^+ a una concentración de 10 μ M, tanto en ausencia como en presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1 (Figura 65).

Los efectos observados en la complementación funcional en levadura de las distintas delecciones del extremo C-terminal de AtHAK5 podrían deberse a cambios en la actividad del transportador o en la cantidad de proteína presente en la levadura. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se llevó a cabo la extracción de membranas totales de levadura (MyM, apartado 2.3.1) y la detección de la presencia de AtHAK5 mediante un ensayo de inmunodetección (MyM, 2.3.3). La inmunodetección de AtHAK5 se llevó a cabo mediante la utilización de un anticuerpo contra el epítipo de la hemaglutinina (HA), que se introdujo en el extremo amino-terminal de la proteína AtHAK5 WT (Anexo 5) y de todas las construcciones con las delecciones (Anexo 6.1). Con las construcciones que portaban el epítipo HA se realizó el mismo ensayo de complementación funcional mostrado en la Figura 65, obteniéndose los mismos resultados que con las versiones de AtHAK5 sin el epítipo.

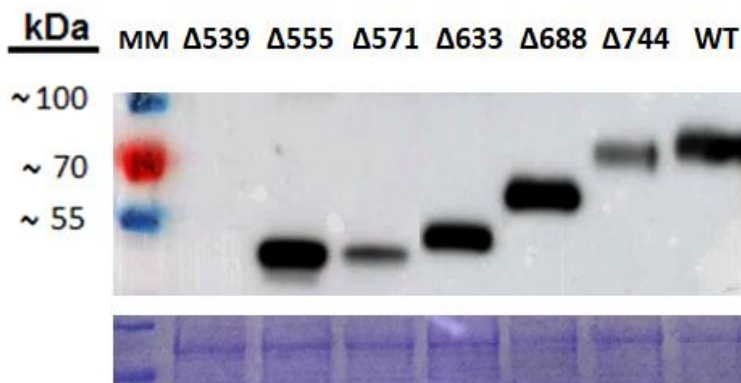


Figura 66. Ensayo de inmunodetección del epítipo de la HA, presente en AtHAK5 WT y en las construcciones de AtHAK5 con deleciones seriadas de su dominio C-terminal. A) Detección de la presencia de AtHAK5 silvestre (WT) y de las construcciones de AtHAK5 con deleciones en su dominio C-terminal, en extractos de membranas totales de levadura 9.3. La electroforesis de las proteínas se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 8 %. El marcador de peso molecular (MM) empleado se corresponde con PageRuler™ Plus Prestained Protein (Thermo Fischer Scientific). B) Tinción con azul de Coomassie de la membrana utilizada para la inmunodetección.

Como se observa en la Figura 66, la eliminación del extremo C-terminal desde el residuo 539 (AtHAK5Δ539) supuso la ausencia de proteína AtHAK5 en membranas de levadura, mientras que en el resto de construcciones con las distintas deleciones sí se detectó proteína AtHAK5. De la Figura 66 se concluye que no habría relación entre la cantidad de proteína detectada con la capacidad de complementación. Por ejemplo, AtHAK5Δ555 y AtHAK5Δ571 presentaron una complementación similar (Figura 65), pero se detectó menor cantidad de proteína en AtHAK5Δ571 (Figura 66). Por lo tanto, las diferencias observadas en el crecimiento mediado por las distintas construcciones, se explicarían por cambios en la actividad de las mismas en lugar de por cambios en la cantidad de proteína. Como se ha mencionado anteriormente, no se detecta proteína de la construcción AtHAK5Δ539 (Figura 66). El hecho de que el transportador AtHAK5 con la siguiente deleción (AtHAK5Δ555) complemente en levadura (Figura 65) y se detecte proteína en el ensayo de inmunodetección (Figura 66) sugiere que los aminoácidos localizados entre los residuos 539 y 555 podrían ser esenciales para la síntesis de la proteína o para la estabilidad de la misma.

Comparando las construcciones AtHAK5Δ571 y AtHAK5Δ633, se observó que la presencia de los aminoácidos desde el 572 hasta el 632 dio lugar a una menor actividad transportador, al mismo tiempo que se mantenía la falta de regulación por AtCIPK23/AtCBL1. Teniendo en cuenta que estas diferencias no podrían explicarse por diferencias en la cantidad de proteína, una posible explicación sería que entre los residuos 571 y 633 existiera un dominio auto-inhibidor, de tal forma que en ausencia de este dominio (AtHAK5Δ571), la actividad del

transportador es mayor y en presencia del mismo (AtHAK5 Δ 633), la actividad del transportador disminuye. Dicho dominio podría estar inhibiendo la actividad de AtHAK5 en ausencia de AtCIPK23/AtCBL1, y la inhibición podría liberarse en presencia de este complejo. Por otra parte, los resultados serían compatibles con la presencia de un dominio de activación, mediada por AtCIPK23/AtCBL1, en el fragmento del C-terminal siguiente (a partir del residuo 633), ya que en las construcciones AtHAK5 Δ 688 y AtHAK5 Δ 744, la actividad del transportador vuelve a ser dependiente de AtCIPK23/AtCBL1.

Para comprobar si la actividad observada se mantenía al delecionar exclusivamente el posible dominio auto-inhibitorio, se llevó a cabo la delección interna de dicho dominio (Δ 572-625) (Anexo 6.3). Se transformó la cepa 9.3 con el ADNc de AtHAK5 Δ 572-625, en presencia y ausencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1 y se realizó el mismo ensayo de crecimiento de levadura a bajo K⁺ llevado a cabo con el resto de construcciones. Como se observa en la Figura 67, la delección interna del posible dominio auto-inhibitorio (Δ 572-625) dio lugar a un transportador que no permitió que las células de levadura creciesen a bajas concentraciones de K⁺.

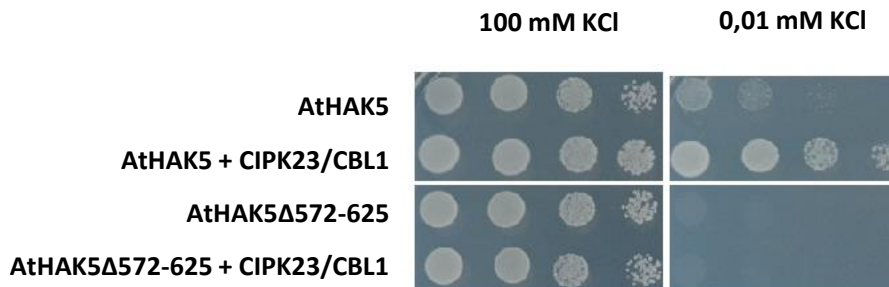


Figura 67. Caracterización funcional del transportador AtHAK5 con una delección interna desde el aminoácido 572 hasta el 625, ambos incluidos. Se muestra el crecimiento en medio PA de células de levadura 9.3 que expresan AtHAK5 silvestre (AtHAK5) y el mutante de AtHAK5 con la delección Δ 572-625, en ausencia y cotransformadas con el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (+ CIPK23/CBL1).

2.3-OTROS MECANISMOS DE REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DE AtHAK5.

Entre los mecanismos de regulación postraducciona, se ha descrito la formación de complejos homo y hetero-méricos de canales y transportadores de K⁺ para llevar a cabo su función en la adquisición de K⁺ (Daram, P. y col., 1997; Dreyer, I. y col., 1997; Lebaudy, A. y col.,

2008; Geiger, D. y col., 2009; Naso, A. y col., 2009; Lebaudy, A. y col., 2010; Daras, G. y col., 2015).

En el ensayo de inmunodetección realizado en el apartado anterior para detectar la presencia de proteína AtHAK5 en membranas totales de levadura, además de la proteína correspondiente al tamaño de AtHAK5 (Figura 66) se observó la presencia de bandas de mayor tamaño, cuya movilidad también se veía afectada por la delección correspondiente del dominio C-terminal de AtHAK5. (Figura 68).

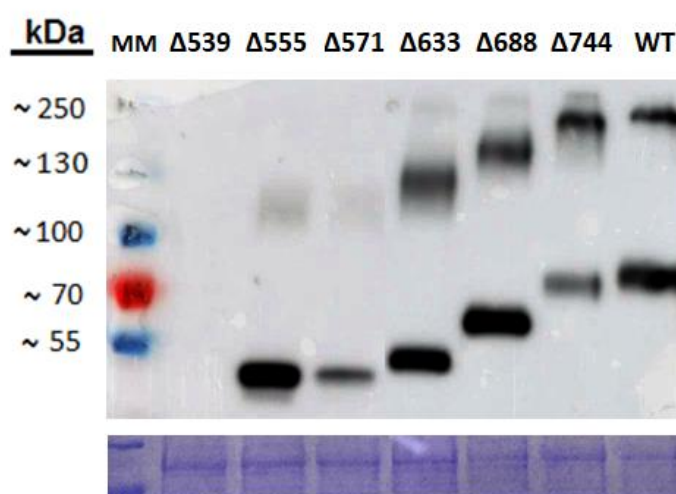


Figura 68. Ensayo de inmunodetección del epítipo de la HA, presente en las construcciones de AtHAK5 WT y con delecciones seriadas de su dominio C-terminal. A) Se muestra el mismo ensayo de inmunodetección de la Figura 66, incluyendo la parte superior de la imagen. Detección de la presencia de AtHAK5 silvestre (WT) y de las construcciones de AtHAK5 con delecciones en su dominio C-terminal, en extractos de membranas totales de levadura 9.3. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 8 %. El marcador de peso molecular (MM) empleado se corresponde con PageRuler™ Plus Prestained Protein (Thermo Fischer Scientific). B) Tinción con Azul de Coomassie de la membrana utilizada para la inmunodetección.

Se pensó que estas proteínas de mayor tamaño podrían estar constituidas por asociaciones de la proteína AtHAK5 consigo misma formando complejos HAK5-HAK5, o con otras proteínas formando agregados. Para estudiar estos complejos, se llevaron a cabo experimentos de inmunodetección con el extracto de membranas correspondiente a levaduras transformadas con AtHAK5 silvestre, sometido a condiciones reductoras más severas que las empleadas en los ensayos estándar, consistentes en el tratamiento con el agente reductor DTT a concentraciones crecientes. Sin embargo, los tratamientos con DTT no dieron lugar a la desaparición de las proteínas de mayor tamaño ni se observó una relación proporcional entre

Resultados y Discusión: Capítulo 2

la cantidad de DTT añadida y la intensidad de las mismas (Figura 69). También se ensayaron distintos tratamientos de las muestras de proteínas antes de ser cargadas en el gel de electroforesis que consistían en someter las muestras a distintas temperaturas y durante tiempos distintos, pero no se observó la desaparición de las bandas de mayor tamaño (Resultado no mostrado).

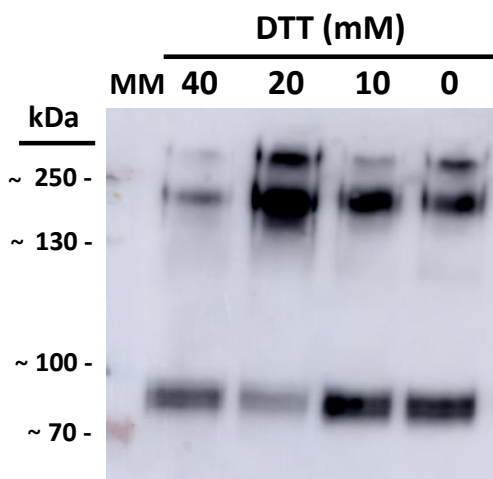


Figura 69. Ensayo de inmunodetección del epítipo de la HA presente en AtHAK5, en condiciones reductoras. Detección de la presencia de AtHAK5 silvestre (WT) de extractos de membranas totales de levadura 9.3, tras someter la muestra a concentraciones crecientes de DTT antes de su carga en el gel de electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 8 %. El marcador de peso molecular (MM) empleado se corresponde con PageRuler™ Plus Prestained Protein (Thermo Fischer Scientific).

Las bandas de gran tamaño se observaron en células de levadura transformadas con AtHAK5 tanto en ausencia (Figura 70A) como en presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1 (Figura 70B), por lo que se consideró que AtCIPK23/AtCBL1 no estaría participando en la formación de estos complejos ni facilitaría la formación de los mismos.

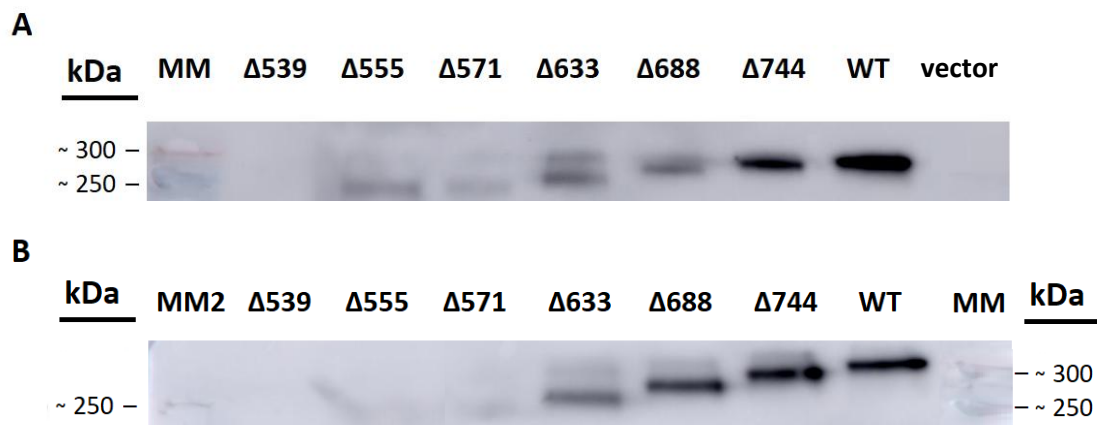


Figura 70. Ensayo de inmunodetección del epítipo de la HA, presente en las construcciones de AtHAK5. A) Detección de la presencia de AtHAK5 silvestre (WT) y de las construcciones de AtHAK5 con deleciones en su dominio C-terminal, de extractos de membranas totales de levadura 9.3. ‘Vector’ hace referencia al plásmido pDR195 vacío, correspondiente al control negativo. B) Detección de la presencia de AtHAK5 silvestre (WT) y de las construcciones de AtHAK5 con deleciones en su dominio C-terminal, en presencia de AtCIPK23/AtCBL1, de extractos de membranas totales de levadura 9.3. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 12%. MM, indica el marcador de peso molecular Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder; y MM2, se corresponde con PageRuler™ Plus Prestained Protein (Thermo Fischer Scientific).

Una posibilidad era que las bandas de mayor tamaño consistieran en asociaciones de AtHAK5 consigo mismo. Para estudiar la posibilidad de interacción HAK5-HAK5 *in planta*, se realizó un ensayo de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) en hojas de *N. benthamiana* (MyM apartado 2.3.5.2), mediante el sistema SPYCE/SPYNE. Para ello, se clonó el ADNc de AtHAK5 fusionado con el ADNc correspondiente al dominio C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP) en el vector pSPYCE (M) (construcción a la que se denominó HAK5::YFP_{C155}) y el ADNc de la proteína AtHAK5 fusionada al ADNc correspondiente al dominio N-terminal de YFP en el vector pSPYNE173 (construcción HAK5::YFP_{N173}) (Anexo 8).

Se transformó la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* (MyM apartado 2.1.3.1.3) con las distintas construcciones y se infiltraron las hojas de *N. benthamiana* (MyM apartado 2.1.3.3.1). Como controles negativos se utilizaron: la construcción AtHAK5::YFP_{C155} co-infiltrada con el plásmido pSPYNE vacío (SPYNE_{N173}) y la construcción HAK5::YFP_{N173} co-infiltrada con SOS1::YFP_{C155} (la proteína AtSOS1 fusionada al extremo C-terminal de YFP, clonada en el plásmido pSPYCE). Como control positivo, se utilizó la construcción SOS1::YFP_{C155} co-infiltrada con la construcción SOS1::YFP_{N173}, proteína cuya interacción consigo misma *in planta* ha sido demostrada (Dr. Quintero, del centro IBVF-CSIC, comunicación personal).

Resultados y Discusión: Capítulo 2

A los 2 y 3 días de la agroinfiltración, se observaron las muestras mediante microscopía confocal. La expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* de las fusiones de HAK5::YFP_{C155} y HAK5::YFP_{N173} originó señal fluorescente (Figura 71), indicando que podría existir interacción HAK5-HAK5.

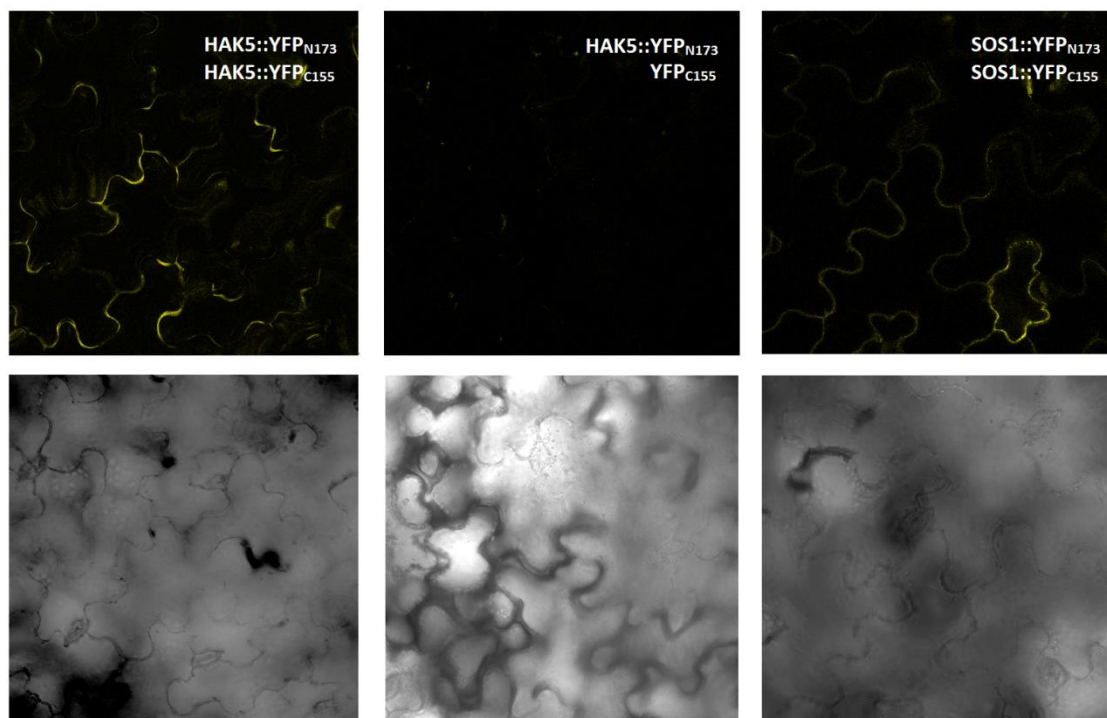


Figura 71. Interacción HAK5-HAK5 mediante un ensayo de BiFC. Se llevó a cabo la transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana* con plásmidos que expresaban las fusiones de las proteínas de estudio, HAK5::YFP_{N173} y HAK5::YFP_{C155}; el control negativo con las construcciones HAK5::YFP_{N173} y YFP_{C155}; y el control positivo, constituido por las construcciones SOS1::YFP_{N173} y SOS1::YFP_{C155}. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal tres días después de la agroinfiltración. Se muestran secciones de hojas de *N. benthamiana*.

Posteriormente, se procedió a determinar los dominios de AtHAK5 que podrían estar implicados en la interacción. Se podría pensar que el dominio C-t no estaría involucrado puesto que los complejos proteicos aparecen en los ensayos de inmunodetección con las distintas delecciones. Sin embargo, habría que destacar que las bandas de gran tamaño en las construcciones AtHAK5 Δ 555 y AtHAK5 Δ 571, muestran menor intensidad que las bandas del resto de construcciones (Figuras 68 y 70), por lo que no se puede descartar que una parte del extremo C-t pudiera estar participando en la estabilidad de los complejos.

Se ha descrito que el transportador perteneciente a la familia HAK/KUP/KT, AtKUP4 interacciona consigo mismo, formando un homodímero, para llevar a cabo la absorción de K⁺,

y esta interacción se produce entre los mismos dominios de dos subunidades AtKUP4. En concreto, se produce interacción entre el dominio C-t de una proteína AtKUP4 con el dominio C-t de otra proteína AtKUP4; el dominio N-t con el dominio N-t, y entre un dominio citoplasmático presente en AtKUP4 con el mismo dominio de otra proteína AtKUP4 (Daras, G. y col., 2015).

Teniendo esto en cuenta, se estudió si de igual forma que en el transportador AtKUP4, un dominio citoplasmático de una subunidad de AtHAK5 podría estar interaccionando con el mismo dominio de la otra subunidad de AtHAK5 (Figura 72).

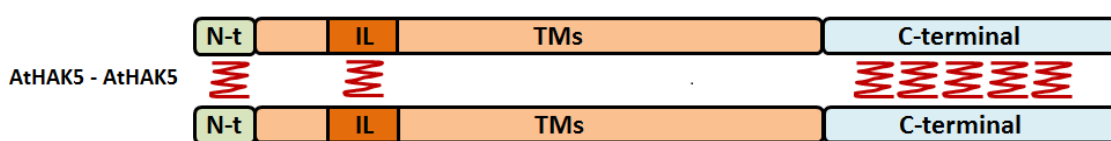


Figura 72. Hipótesis de la interacción de AtHAK5 consigo mismo en la formación de un homodímero. N-t representa el dominio N-terminal de AtHAK5; IL, indica el dominio denominado 'Internal Loop'; TMs hace referencia a los dominios transmembrana; y C-terminal, al dominio C-terminal de AtHAK5. El símbolo en rojo indicaría la interacción entre los dominios.

Para ello, se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H) mediante el sistema ProQuest™ Two-Hybrid System (Clontech) (MyM apartado 2.3.5.1). La estrategia para la generación de las construcciones, se recoge en el Anexo 7.

La construcción del dominio C-t de AtHAK5 fusionada al dominio AD del factor de transcripción GAL4 (C-t::AD) se cotransformó con la construcción del dominio C-t de AtHAK5 fusionada al dominio BD del factor de transcripción GAL4 (C-t::BD); y la construcción del dominio IL de AtHAK5 fusionada al dominio AD del factor de transcripción GAL4 (IL::AD), se cotransformó con la construcción del dominio IL de AtHAK5 fusionada al dominio BD del factor de transcripción GAL4 (IL::BD).

Los controles negativos los constituyeron las distintas construcciones de estudio cotransformadas con los plásmidos vacíos correspondientes. El control positivo utilizado en el ensayo consistió en el dominio C-terminal de la proteína AtCIPK23 fusionado al 'dominio de activación' de GAL4 (construcción CIPK23::AD) y AtCBL1 fusionada al 'dominio de unión al ADN' de GAL4 (construcción CBL1::BD), proteínas cuya interacción se ha demostrado previamente en un ensayo de doble híbrido en levadura (Lee, S.C. y col., 2007) .

Resultados y Discusión: Capítulo 2

La falta de crecimiento de las levaduras observada en el medio SD carente del aminoácido histidina (Figura 73) indicó que los dominios C-t e IL, no estarían interaccionando con ellos mismos en el ensayo Y2H llevado a cabo. La realización de la construcción para ensayar la interacción del dominio N-t no se ha podido realizar a tiempo para exponer los resultados en esta memoria de Tesis Doctoral.

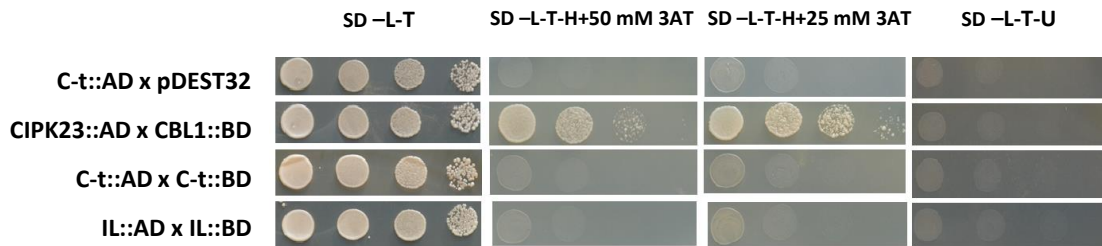


Figura 73. Ensayo de Y2H para comprobar si existe interacción entre dos dominios C-t de AtHAK5 y entre dos dominios IL de AtHAK5. Se muestra uno de los controles negativos (construcción del dominio C-t fusionado al dominio AD de GAL4, C-t::AD, cotransformada con el plásmido pDEST32 vacío; y el control positivo (construcción CIPK23::AD cotransformada con CBL1::BD). El crecimiento en medio SD carente de leucina y de triptófano (SD-L-T) indicaría la correcta transformación de los plásmidos; el crecimiento en el medio SD carente de leucina, triptófano y de histidina (SD-L-T-H) en presencia de distintas concentraciones de 3AT, indicaría interacción débil; el crecimiento en el medio SD carente de leucina, triptófano y de uracilo (SD-L-T-U) indicaría una interacción fuerte entre las proteínas de estudio.

3- RESIDUOS DE AtHAK5 IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE DE K⁺.

La identificación de residuos funcionales implicados en la adquisición de K⁺ ha sido el objetivo abordado en este apartado de Tesis, con el fin de generar herramientas que posibiliten obtener versiones de HAK5 más eficientes en la captación de K⁺.

Estudios previos de este grupo de investigación mostraron que la mutación F130S en AtHAK5 podía incrementar la selectividad por el K⁺ frente a Na⁺ y Cs⁺. La expresión en levadura del mutante AtHAK5 F130S confiere tolerancia a Na⁺ y Cs⁺ (Aleman, F. y col., 2014). Por tanto, conocer los dominios clave de los transportadores HAK5 que determinan la selectividad y la actividad de estos transportadores podría conducir a incrementar la eficiencia de los mismos en la adquisición de K⁺ en condiciones adversas, como el caso de bajas concentraciones de este ion en el medio, presencia de Na⁺ y Cs⁺, etc.

El papel fisiológico de los transportadores HAK/KUP/KT se ha estudiado y caracterizado en numerosos organismos; sin embargo, existe muy poca información sobre la estructura de la proteína de dichos transportadores y no se han identificado los aminoácidos implicados en la unión selectiva del K⁺ y su transporte. Por el contrario, en los canales de K⁺ se han identificado los aminoácidos que constituyen el poro por el que el K⁺ se une al canal para atravesar la membrana plasmática (Durell, S.R. y Guy, H.R., 1999; Mackinnon, R. y Yellen, G., 1990; Hidalgo, P. y Mackinnon, R., 1995). Este poro está constituido por el motivo GYGD (glicina-tirosina-glicina-ácido aspártico) (Heginbotham, L. y col., 1992; Heginbotham, S.H. y Mackinnon, R., 1993), altamente conservado en los canales de K⁺ de animales, bacterias, hongos y plantas (Doyle, D.A. y col., 1998). La selectividad por el K⁺ de los residuos que forman el poro vendría determinada por la interacción del ion K⁺ con los grupos carbonilo de las glicinas y por interacciones electrostáticas dentro del poro (Mackinnon, R., 2003; Roux, B. y Mackinnon, R., 1999).

Los transportadores HAK de plantas presentan características estructurales similares a los transportadores Kup-HAK de bacterias y hongos (Rodríguez-Navarro, A., 2000). Los análisis estructurales revelan la presencia de entre 10 y 15 fragmentos transmembrana (TM) con las regiones N-terminal y C-terminal situadas en el citoplasma, así como una región también citoplasmática, que se ha denominado '*Internal Loop*' entre los segmentos TM2 y TM3 (Rubio, F. y col., 2000; Gomez-Porras, J.L. y col., 2012; Bañuelos, M.A. y col., 2002; Quintero, F.J. y Blatt, M.R., 1997).

lateral), para lo cual se diseñaron los cebadores adecuados (recogidos en el Anexo 2) con cambios en la secuencia respecto a la silvestre, que son introducidos en la reacción de amplificación de ADN por PCR, lo que conlleva la sustitución de un aminoácido por otro. Las versiones mutantes obtenidas se recogen en la Tabla 48.

Tabla 48. Secuencias de AtHAK5 silvestre (WT) y versiones mutantes obtenidas de la sustitución del aminoácido original por alanina, de los residuos que constituyen el posible dominio poro de estudio y los aminoácidos de carácter ácido conservados. En rojo se muestra el aminoácido alanina (A) que sustituye al original (en negrita).

AtHAK5 WT	⁶⁷ GVVYGDIG ₇₄	AtHAK5 WT	²⁰⁰ GDGILTP ₂₀₆	AtHAK5 WT	³⁰⁹ TGTEAMFA ₃₁₆
Mutante poro	⁶⁷ AVV AAA IA ₇₄	D201A	²⁰⁰ G A GILTP ₂₀₆	E312A	³⁰⁹ TGT A AMFA ₃₁₆
G67A	⁶⁷ AVVYGDIG ₇₄				
Y70A	⁶⁷ GVV A GDIG ₇₄				
G71A	⁶⁷ GVVY A DIG ₇₄				
D72A	⁶⁷ GVVYGA I G ₇₄				
G74A	⁶⁷ GVVYGD I A ₇₄				

Con el objeto de estudiar funcionalmente el efecto de las mutaciones se utilizó el sistema heterólogo de levadura. Los ADNc se clonaron en el vector de expresión pDR195, y el complejo AtCIPK23/AtCBL1 se clonó en el vector p414GPD. Los vectores se transformaron en la cepa de *S. cerevisiae* 9.3 (*trk1*, *trk2*) y se llevó a cabo un ensayo de complementación funcional, de igual forma al descrito anteriormente, para analizar el crecimiento de las células de levadura transformadas con los distintos mutantes, tanto en presencia como en ausencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1, con distintas concentraciones de K⁺. (Figuras 75 y 76).

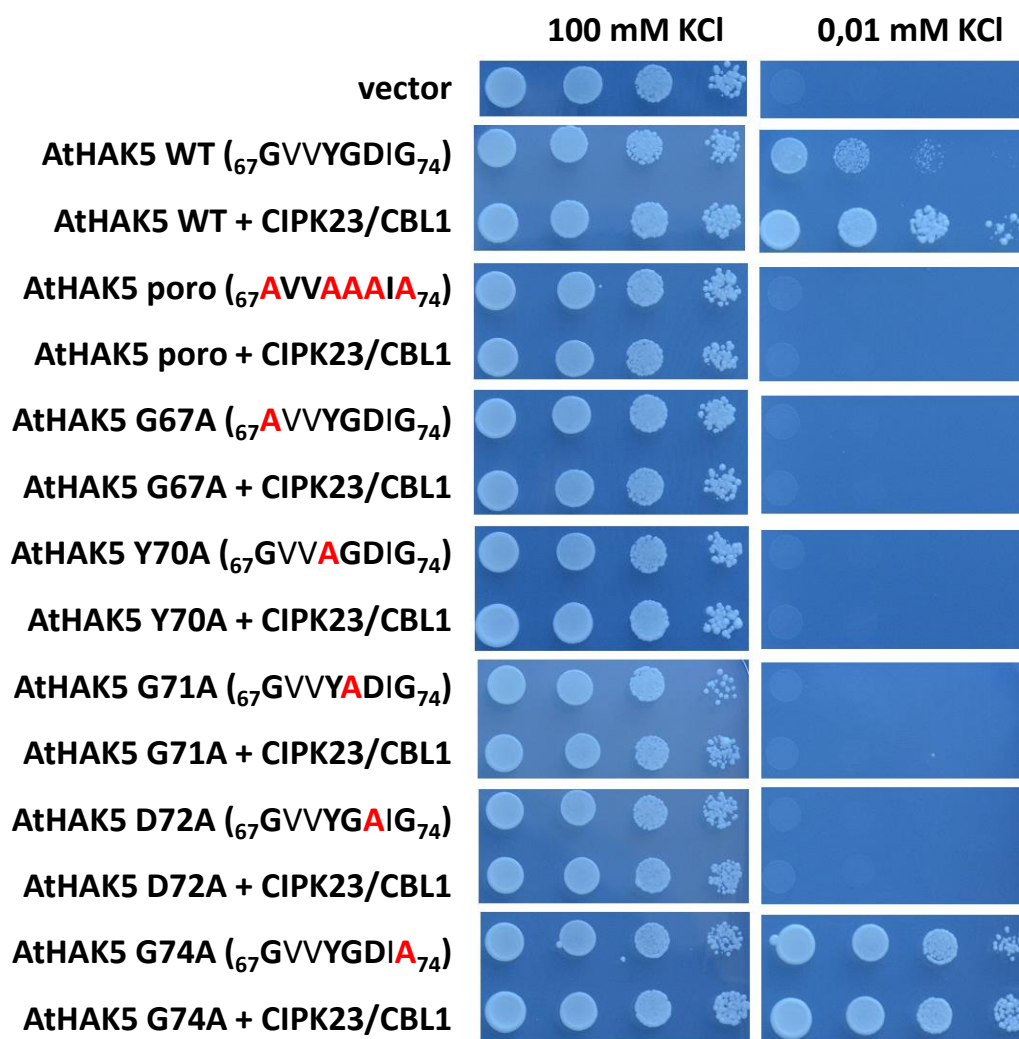


Figura 75. Caracterización funcional del transportador AtHAK5 con mutaciones en los residuos que podrían constituir el dominio poro de unión al K^+ , en ausencia y presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1, en condiciones de bajo K^+ . Se muestra el crecimiento en medio PA de células de levadura 9.3 que expresan el plásmido vacío (vector), AtHAK5 silvestre (AtHAK5) y los mutantes AtHAK5 con las distintas sustituciones, en ausencia o cotransformadas con el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (+ CIPK23/CBL1), en un medio control con K^+ suficiente (100 mM) y a bajo K^+ (0,01 mM).

La sustitución por alanina de todos los aminoácidos que podrían constituir el poro de AtHAK5 (Figura 75), dio lugar a un transportador AtHAK5 que no es funcional en la adquisición de K^+ a concentraciones de 0,01 mM, tanto en ausencia como en presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1. Los mutantes que tenían mutado un solo aminoácido de la región del poro, tampoco crecieron a concentraciones de 0,01 mM de K^+ ; a excepción del mutante en la G74A, el cuál creció en condiciones de bajo K^+ y de forma independiente a la presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1. Los mutantes D201A y E312A generados por la sustitución de estos

aminoácidos ácidos conservados no permitieron el crecimiento de la levadura en condiciones de bajo K^+ , tanto en ausencia como en presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1 (Figura 76).

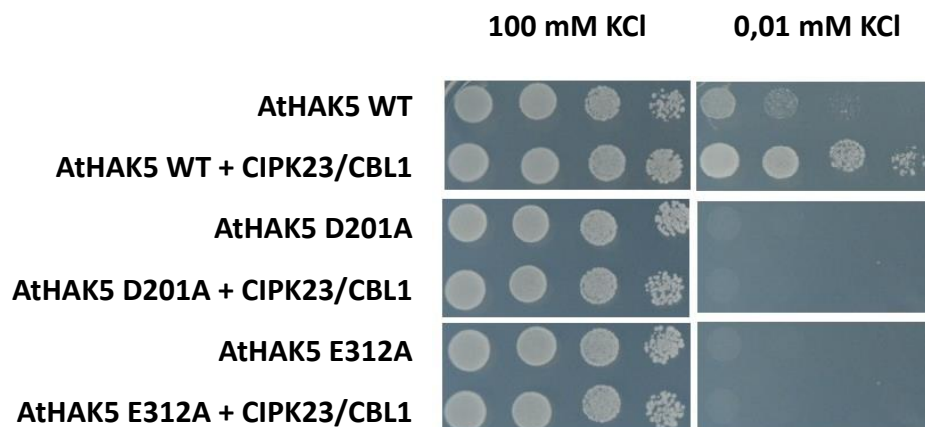


Figura 76. Caracterización funcional del transportador AtHAK5 con mutaciones en los residuos aminoácidos de carácter ácido, en ausencia y presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1, en condiciones de bajo K^+ . Se muestra el crecimiento en medio PA de células de levadura 9.3 que expresan el plásmido de AtHAK5 silvestre (AtHAK5) y los mutantes AtHAK5 con las distintas sustituciones, en ausencia o cotransformadas con el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (+ CIPK23/CBL1), en un medio control con K^+ suficiente (100 mM) y a bajo K^+ (0,01 mM).

Tras observar que el mutante AtHAK5 G74A creció mejor que AtHAK5 WT a baja concentración de K^+ (Figura 75), se consideró estudiar los residuos situados a continuación del posible dominio poro, en concreto, se llevaron a cabo las sustituciones puntuales de los residuos S76 y P77 (Tabla 49).

Tabla 49. Secuencias de AtHAK5 silvestre (WT) y versiones mutantes obtenidas de la sustitución del aminoácido original por alanina, de los residuos que constituyen la región adyacente al posible dominio poro de AtHAK5. En rojo se muestra el aminoácido alanina (A) que sustituye al original (en negrita).

AtHAK5 WT	₆₇ GVVYGDIGT SP ₇₇
S76A	₆₇ GVVYGDIGT AP ₇₇
P77A	₆₇ GVVYGDIGT SA ₇₇

De igual forma que el mutante AtHAK5 G74A, los mutantes S76A y P77A, crecieron en condiciones de bajo K^+ de forma independiente a la activación AtCIPK23/AtCBL1 (Figura 77).

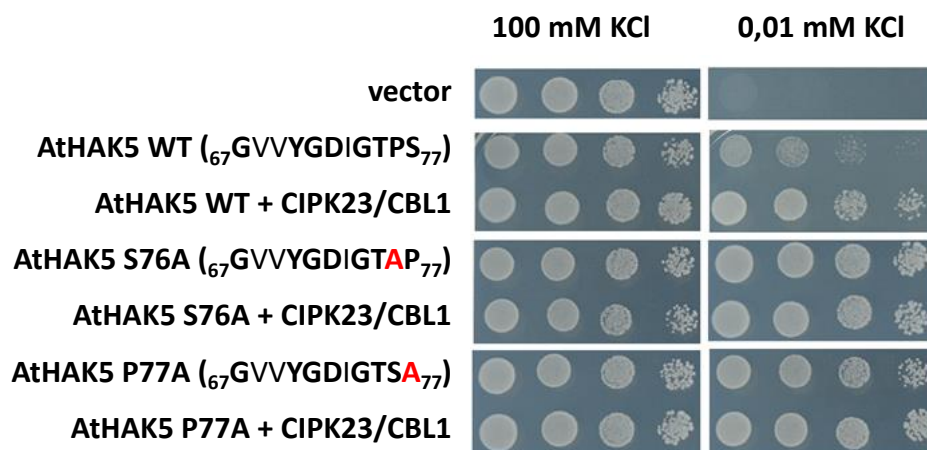


Figura 77. Caracterización funcional del transportador AtHAK5 con mutaciones en los residuos aminoácidos adyacentes al posible el dominio poro de unión al K⁺, en ausencia y presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1. K⁺. Se muestra el crecimiento en medio PA de células de levadura 9.3 que expresan el plásmido vacío; AtHAK5 silvestre (AtHAK5) y los mutantes AtHAK5 con las distintas sustituciones señaladas (S76A y P77A), en ausencia o cotransformadas con el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (+ CIPK23/CBL1), en un medio control con K⁺ suficiente (100 mM) y a baja concentración de K⁺ (0,01 mM).

Para comprobar si la falta de función en los mutantes que no complementaban la levadura se debía a la ausencia o a una menor concentración de proteína AtHAK5 en la misma, se llevó a cabo la extracción de membranas totales de proteínas de la levadura y el posterior ensayo de inmunodetección de la proteína AtHAK5 (MyM apartado 2.3.3). Para ello, se introdujo el epítipo HA en la secuencia de los mutantes de AtHAK5 generados, de igual forma a como se introdujo en AtHAK5 WT (Anexo 5).

En la Figura 78, se observa el resultado del ensayo de inmunodetección realizado con dos muestras que mostraron distinta capacidad de complementación en levadura en el ensayo de crecimiento en medio sólido: el mutante G67A, que no creció en condiciones de bajo K⁺; y el mutante G74A, que creció a bajo K⁺ y de forma independiente al complejo AtCIPK23/AtCBL1 (Figura 75). Ambos mutantes mostraron proteína y en cantidad similar a AtHAK5 silvestre (Figura 78), por lo que la falta de actividad en el mutante G67A en la adquisición de K⁺ a baja concentración en el medio no parece ser debida a la ausencia de proteína AtHAK5 ni a una menor cantidad de la misma; ni la mayor actividad observada en el mutante AtHAK5 G74A, parece ser causada por la presencia de una mayor cantidad de proteína AtHAK5.

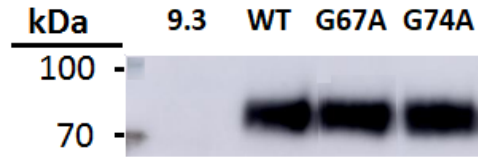


Figura 78. Ensayo de inmunodetección del epítipo de la HA presente en AtHAK5 WT y en los mutantes G67A y G74A. Detección de la presencia de AtHAK5 silvestre (WT) y de las construcciones de AtHAK5 con mutaciones en los residuos G67 y G74, en extractos de membranas totales de levadura 9.3. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 8 %. El marcador de tamaño molecular (MM) empleado se corresponde con PageRulerTM Plus Prestained Protein (Thermo Fischer Scientific).

DISCUSIÓN

En este capítulo 2 de Tesis Doctoral se ha realizado un estudio general sobre el transportador de alta afinidad HAK5. En Arabidopsis, estudios previos han demostrado la implicación de ciertos componentes que participan en la señalización por bajo K^+ y mecanismos de respuesta a dicha situación.

El primer apartado tenía como objetivo estudiar si los mecanismos de señalización en respuesta al ayuno de K^+ que han sido identificados en Arabidopsis, estarían presentes también en las plantas de tomate.

Estudios previos en Arabidopsis (Nieves-Cordones, M. y col., 2010; Rubio, F. y col., 2014; Rubio, F. y col., 2008) y en plantas de tomate (Nieves-Cordones, M. y col., 2007; Nieves-Cordones, M. y col., 2008) mostraron que la deficiencia de K^+ hiperpolariza el potencial de la membrana plasmática de las células de raíz y es posiblemente la primera señal que lleva a la inducción de la transcripción del gen responsable de la absorción de K^+ de alta afinidad, *SIHAK5*. Como consecuencia, las raíces desarrollan la capacidad de absorber el K^+ desde concentraciones correspondientes al rango de la alta afinidad. La presencia de Na^+ durante el ayuno de K^+ despolariza el potencial de membrana y reprimiría la inducción del gen *HAK5* asociada a la falta de K^+ , lo que lleva a una disminución de la capacidad de absorción de K^+ de alta afinidad.

En este trabajo se han caracterizado los efectos de la presencia de Ca^{2+} y Na^+ sobre la inducción de la absorción de K^+ de alta afinidad, a través de la influencia sobre la transcripción del gen *SIHAK5* en plantas de tomate. Se ha demostrado que la represión del gen *SIHAK5* por la presencia de Na^+ , puede ser revertida parcialmente por altos niveles de Ca^{2+} mediante un mecanismo que implica la reducción de la despolarización del potencial de membrana inducida por Na^+ (Figura 52), lo que reestructuraría la cascada de señalización por bajo K^+ , permitiendo la inducción del gen *SIHAK5* (Figura 51) y la capacidad de absorber K^+ en el rango de alta afinidad por las raíces de las plantas de tomate (Figura 46). Los efectos beneficiosos que produce el Ca^{2+} repercuten sobre el influjo de K^+ , ya que se han observado resultados similares en presencia y ausencia de 10 mM de TEA (Figura 48), un inhibidor de canales de salida de K^+ (Hoopen, F.T. y col., 2010; Very, A.A. y Sentenac, H., 2002). Esta absorción solamente puede ser mediada por dos sistemas: un sistema sensible al NH_4^+ mediada por el transportador *SIHAK5*; o un sistema sensible al Ba^{2+} mediada por el canal LKT1. Los resultados obtenidos muestran que el efecto del Ca^{2+} sobre la absorción de K^+ se produce a través de su absorción

por el transportador SIHAK5, puesto que la absorción se inhibió en presencia de NH_4^+ en los dos niveles de Ca^{2+} estudiados, y no por la presencia de Ba^{2+} externo (Figura 47).

El mecanismo por el cual el Ca^{2+} prevendría la despolarización de la membrana plasmática inducida por Na^+ observada en situación de ayuno de K^+ es desconocido. Se sabe que los niveles altos de Ca^{2+} externo reducen la absorción de Na^+ y su acumulación en raíces (Chen, Z. y col., 2007; Nieves-Cordones, M. y col., 2008; Nieves-Cordones, M. y col., 2010; Shabala, S. y col., 2006; Shabala, S. y col., 2003), lo que podría prevenir esta despolarización. Sin embargo, bajo las condiciones estudiadas, el tratamiento con alto Ca^{2+} redujo la acumulación de Na^+ en la parte aérea (Figura 50E), pero no se observó una disminución en las concentraciones de Na^+ en raíz, respecto a las tratadas con bajo Ca^{2+} (Figura 50F) por lo que este efecto sobre el potencial de membrana no parece estar relacionado con las concentraciones de Na^+ en la raíz. Shabala, S. y col., (2003) también observaron en cebada que la despolarización del potencial de la membrana plasmática inducida por Na^+ , se revirtió por altos niveles de Ca^{2+} , sin modificar la absorción de Na^+ .

Este efecto producido por el alto nivel de Ca^{2+} tampoco parece ser debido a su influencia sobre las concentraciones de K^+ en raíz ya que las plantas tratadas con alto Ca^{2+} en ausencia de Na^+ mostraron mayores concentraciones de K^+ que aquellas crecidas con bajos niveles de Ca^{2+} (Figura 50B), y sin embargo, ambas raíces mostraron valores similares del potencial de membrana plasmática. Además, las raíces tratadas con 20 mM de Na^+ mostraron concentraciones de K^+ similares en presencia de ambos niveles de Ca^{2+} , y presentaban potenciales de membrana distintos (Figura 52). Considerando que el tratamiento con alto nivel de Ca^{2+} produjo mayores concentraciones de Ca^{2+} en raíz y parte aérea (Figura 50 C y D), y un potencial de membrana más negativo (Figura 52), los niveles de Ca^{2+} internos podrían ser los responsables del mantenimiento del potencial de membrana.

Los resultados de esta Tesis Doctoral indican que el etileno y las ROS podrían estar implicados en la vía de señalización de la falta de K^+ en plantas de tomate. La producción de etileno aumenta en las plantas de *Arabidopsis* ayunadas de K^+ (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004) y en este estudio se observó que la presencia de Ag^+ en la solución nutritiva, bloqueante de la acción del etileno, redujo la capacidad de absorción de K^+ en el rango de alta afinidad por raíces de plantas de tomate ayunadas de K^+ (Figura 53), lo que podría deberse a la inhibición que se observó de la inducción del gen *SIHAK5* (Figura 54).

También se ha determinado el efecto de la presencia de DPI, un inhibidor de la producción de ROS, sobre la inducción del gen *SIHAK5* y la absorción de K^+ en las plantas de tomate. La represión de la inducción de *SIHAK5* (Figura 54) y la disminución de la absorción de K^+ de alta afinidad (Figura 53) en presencia de DPI, indican que la producción de ROS también estaría implicada en la señalización por falta de K^+ en plantas de tomate, regulando los niveles de transcrito de *SIHAK5*.

Tras observar (Capítulo 1, apartado 2) que debía existir un mecanismo o mecanismos de regulación postranscripcional de la actividad del transportador HAK5, se llevaron a cabo diferentes estudios para profundizar en su conocimiento. En el apartado 2 de este Capítulo 2 de Tesis Doctoral se demuestra que el complejo AtCIPK23/AtCBL1 estaría regulando la actividad del transportador AtHAK5, responsable de la adquisición de K^+ en el rango de alta afinidad. Este complejo AtCIPK23/AtCBL1 también activa transportadores homólogos a AtHAK5 en otras especies, como *E. salsginea*, pimiento y tomate (Figura 61). Otros estudios muestran la activación del canal AKT1 también por AtCIPK23/AtCBL1-9 (Xu, J. y col., 2006; Li, L. y col., 2006), por lo que este complejo parece funcionar como un regulador central en procesos esenciales para la adquisición de K^+ .

La activación de AtHAK5 por el complejo AtCIPK23/AtCBL1 constituye un mecanismo de regulación postranscripcional de dicho transportador crucial para la supervivencia de *Arabidopsis* a concentraciones inferiores a $10 \mu\text{M}$ (Figura 60). Dicha activación conlleva una modificación en sus propiedades cinéticas (K_m y V_{max}) (Figura 56), que podría asociarse a un cambio conformacional del transportador por la acción del dominio quinasa de AtCIPK23 sobre el mismo. Los análisis de absorción de Rb^+ en levaduras que expresaban AtHAK5 en ausencia o presencia de AtCIPK23/AtCBL1 mostraron el aumento de afinidad de AtHAK5 por el sustrato cuando el transportador se activaba. El valor de K_m descendió desde $20 \mu\text{M}$ cuando AtHAK5 se expresó solo, hasta un valor de $2,6 \mu\text{M}$ cuando se coexpresó con AtCIPK23/AtCBL1. Esta afinidad por el K^+ observada en levadura es muy superior a la presentada por plantas WT de *Arabidopsis*, que oscila entre 21 y $24 \mu\text{M}$ (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Gierth, M. y col., 2005; Pyo, Y.J. y col., 2010). Hay que tener en cuenta que en plantas WT, los sistemas AKT1 y AtHAK5 contribuyen en la absorción de K^+ en condiciones de bajo K^+ y con afinidades distintas. Además, en la afinidad por el K^+ influirían también las condiciones de crecimiento, el grado de ayuno de K^+ y las condiciones en las que se lleva a cabo el ensayo de absorción de K^+ (Martínez-Cordero, M.A. y col., 2004).

El estudio de los distintos mutantes afectados en los sistemas de transporte de K^+ , como los utilizados en el ensayo de crecimiento descrito (Figuras 59 y 60), permitieron determinar las propiedades individuales de estas proteínas en el transporte de K^+ en la planta. Los ensayos realizados en el mutante *cipk23-5* muestran que la ausencia de la proteína AtCIPK23 dio lugar a una menor tasa de absorción de Rb^+ por las raíces de las plantas ayunadas de K^+ (Figura 59) y un crecimiento menor en condiciones de bajo K^+ (Figura 60). La activación de AtHAK5 por AtCIPK23 se deduce por el descenso de la tasa de absorción de Rb^+ en el doble mutante *akt1-2 cipk23-5* respecto al mutante simple *akt1-2* (Figura 59), siendo este descenso del 57 %. De igual forma, se redujo un 43 % la tasa de absorción de Rb^+ llevada a cabo por AKT1 en la línea *hak5-3 cipk23-5* en comparación con el mutante simple *hak5-3* (Figura 59).

Por otra parte, parece que la proteína AtCIPK23 estaría también regulando otros sistemas implicados en la absorción de K^+ a bajas concentraciones. A 0,5 mM de K^+ , se observó un crecimiento nulo del triple mutante *hak5-3 akt1-2 cipk23-5*, mientras que el doble mutante *hak5-3 akt1-1* sí creció a esa concentración de K^+ (Figura 60). La identidad de un sistema distinto a AtHAK5 y AKT1 implicado en la absorción de K^+ a esta concentración cuando ambos sistemas están ausentes es desconocida. Teniendo en cuenta que las proteínas CIPKs regulan diferentes sistemas y que están implicados en funciones distintas (Steinhorst, L. y Kudla, J., 2013), la quinasa AtCIPK23 podría estar involucrada también en la regulación de dicho sistema.

La activación de AtHAK5 por el complejo AtCIPK23/AtCBL1 requirió de la presencia tanto del dominio catalítico como de la región C-terminal de AtCIPK23 (Figura 57). Hay evidencias que indican que la función del dominio catalítico de la quinasa en la modulación del transportador se asocia a su actuación sobre la proteína, y el dominio C-terminal estaría implicado en la regulación de la correcta localización del transportador. El canal AKT1 se encuentra presente en la membrana plasmática en ausencia de AtCIPK23/AtCBL1, y su activación por dicho complejo implica su fosforilación (Lee, S.C. y col., 2007; Li, L. y col., 2006); sin embargo, la activación del canal AKT2 por el complejo AtCIPK6/AtCBL4 puede originarse, de forma parcial, cuando se expresa solamente el dominio catalítico de AtCIPK6, y su transporte del retículo endoplasmático a la membrana plasmática también es regulado por AtCIPK23, siendo suficiente para ello la presencia del dominio C-terminal de la quinasa (Held, K. y col., 2011).

Qi, Z. y col., (2008) mostraron que AtHAK5 se detectaba en el retículo endoplasmático en condiciones de K^+ suficiente, mientras que en ayuno de K^+ la proteína estaba presente principalmente en la membrana plasmática. Según esto, sería posible que este mecanismo de

regulación de un sistema de transporte por una CIPK basado en la translocación del retículo endoplasmático a la membrana plasmática también operara en el caso de AtHAK5 y AtCIPK23. El hecho de que la presencia del dominio C-terminal auto-inhibitorio de AtCIPK23 sea necesario para la complementación funcional en levadura de AtHAK5 (Figura 57) sugiere que la localización del transportador podría estar regulada por esta quinasa. Teniendo todo esto en cuenta, podría considerarse que a bajas concentraciones de K^+ , el complejo AtCIPK23/AtCBL1 podría activarse de forma parcial, activándose únicamente el dominio quinasa de AtCIPK23, siendo suficiente para la regular al canal AKT1 a dichas concentraciones; mientras que una deficiencia severa de K^+ activaría totalmente al complejo, de forma que los dominios quinasa y catalítico de AtCIPK23 llevaran a cabo la regulación de AtHAK5. Esta hipótesis podría explicar que el mismo complejo regulase dos sistemas que operan a distintos rangos de concentración, al igual que este complejo regula al transportador NRT1.1, sistema encargado de la absorción de NO_3^- en los rangos de baja y alta afinidad (Ho, C.H. y col., 2009). Por todo esto, se sugiere que la proteína AtCIPK23 podría estar involucrada tanto en la regulación de la localización subcelular de la transportador AtHAK5 como en la regulación de su actividad mediante fosforilación, pero dichas hipótesis necesitan ser estudiadas con detalle para ser confirmadas. Que la proteína AtCIPK23 esté implicada en la modulación de la absorción de dos de los nutrientes más importantes para las plantas K^+ y NO_3^- , apoyaría la hipótesis de la existencia de interacciones entre los mecanismos de señalización que modulan la adquisición de distintos nutrientes.

Las proteínas CBLs en colaboración con proteínas quinasa CIPKs, llevan a cabo una función esencial en la regulación de sistemas implicados en la respuesta a distintos estreses abióticos (Luan, S. y col., 2002; Weinl, S. y Kudla, J., 2009a). Un análisis filogenético de las CBLs de Arabidopsis divide esta familia en tres grupos en base a su estructura (Batistic, O. y col., 2010). AtCBL10 es el único miembro del Grupo I, posee el N-terminal más largo de la familia (Sanchez-Barrena, M.J. y col., 2013; Batistic, O. y col., 2010) y se localiza tanto en la membrana plasmática como en el tonoplasto. Los miembros del Grupo II (AtCBL1, 4, 5, 8 y 9) contienen el dominio N-terminal más corto. AtCBL1 y AtCBL9 se localizan en la membrana plasmática, mientras que AtCBL4, 5 y AtCBL8 se distribuyen por toda la célula (Batistic, O. y col., 2010). La presencia del dominio MGCXXS/T en las proteínas CBLs puede albergar modificaciones lipídicas para su unión a la membrana plasmática (Batistic, O. y col., 2008; Weinl, S. y Kudla, J., 2009b). El hecho de que AtCBL8 no contenga este motivo sugiere que un mecanismo desconocido estaría implicado en su localización en la membrana. El papel de las proteínas AtCBL1, AtCBL8, AtCBL9 y AtCBL10 en la activación de AtHAK5 junto con AtCIPK23 (Figura 62) estaría apoyado

por el hecho de que estas CBLs se localizan en la membrana plasmática (Batistic, O. y col., 2010; Quan, R. y col., 2007).

Como se muestra en la Figura 63, CIPKs distintas a AtCIPK23 parecen activar AtHAK5 junto con AtCBL1. Según el análisis filogenético realizado por Mao, J.J. y col., (2016), las AtCIPKs con mayor homología estructural a AtCIPK23 son AtCIPK3, AtCIPK9 y AtCIPK26, de las cuales, AtCIPK9 y AtCIPK26 parecen activar AtHAK5 en condiciones de bajo K^+ (Figura 63). El gen que codifica AtCIPK9 se induce por diferentes estreses, como frío, daño tisular y NaCl, y también por ayuno de K^+ (Pandey, G.K. y col., 2007). El mutante nulo en la función de esta proteína, *cipk9*, presenta hipersensibilidad en condiciones de bajo K^+ ; sin embargo, no muestra menor contenido interno de K^+ ni tiene alterada la capacidad de absorber K^+ , por lo que parece que su función no estaría relacionada con la adquisición de K^+ (Pandey, G.K. y col., 2007). Por otra parte, AtCIPK9 interacciona con AtCBL2/AtCBL3 en la membrana vacuolar, participando en la homeostasis de K^+ en condiciones de estrés por bajo K^+ (Liu, L.L. y col., 2013). También en el tonoplasto, la AtCIPK9 parece regular, en coordinación con AtCIPK3/26 y 23 y mediante la interacción con AtCBL2/3, la homeostasis de Mg^{2+} en situaciones de toxicidad por este catión (Tang, R.J. y col., 2012). La quinasa AtCIPK26 interacciona con AtCBL1/AtCBL9 y fosforila a la enzima RBOHF, incrementando la producción de ROS. Y también se ha visto que interacciona con la E3 ligasa tipo RING denominada KEG (*'Keep on Going'*) en la regulación de la señalización de ABA (Lyzenga, W.J. y col., 2017).

La siguiente quinasa más próxima estructuralmente a AtCIPK23 que activó al transportador AtHAK5 en condiciones de bajo K^+ , en el ensayo de complementación en levadura realizado (Figura 63), fue AtCIPK1. Esta quinasa participa en la regulación de la respuesta a estrés, de forma independiente (mediante su interacción con AtCBL1) y dependiente (con AtCBL9) a la señalización de ABA (D'angelo, C. y col., 2006), por lo que AtCIPK1 podría actuar simultáneamente como regulador negativo y positivo. Una explicación posible podría ser que la formación del complejo dependiese de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Batistic, O. y Kudla, J., 2004).

AtCIPK12 parece estar involucrada en el crecimiento del tubo polínico (Steinhorst, L. y col., 2015) mediante su interacción con AtCBL2/3 en la membrana vacuolar. AtCIPK14 participa en la señalización de numerosos estreses en los que están implicados distintos nutrientes como fosfato (Linn, J. y col., 2017), en la relación carbono/nitrógeno (Yasuda, S. y col., 2017), la señalización de glucosa (Yan, J.L. y col., 2014), así como en la regulación en respuesta a NaCl (Qin, Y.Z. y col., 2008). Por todo esto, no sería de extrañar la participación de AtCIPK14 en la

Resultados y Discusión: Capítulo 2

señalización de otro tipo de estrés, como el ayuno de K^+ . En cuanto a las AtCIPKs 10 y 20 no se ha encontrado nada descrito en la literatura.

Un experimento de doble híbrido en levadura donde se ensaya la interacción entre AtCBL1 y las 26 AtCIPKs identificadas en Arabidopsis, demuestra la interacción física de esta proteína con AtCIPK1 y con AtCIPK23 (Kolukisaoglu, U. y col., 2004). Sin embargo, ninguna de las otras AtCIPKs que activan AtHAK5 en presencia de AtCBL1 en condiciones de bajo K^+ mostradas en este estudio interaccionaron con AtCBL1 en el ensayo realizado por (Kolukisaoglu, U. y col., 2004). Una explicación podría ser la alta probabilidad de falsos negativos en un ensayo de doble híbrido en levadura (Xing, S.P. y col., 2016). Otra explicación sería la posibilidad de que estas AtCIPKs activaran AtHAK5 sin necesidad de formar un complejo con una AtCBL, como ocurre en el caso contrario, en el que AtCBL10, es capaz de regular la homeostasis de K^+ por interacción de AKT1, sin necesidad de que este presente ninguna CIPK (Ren, X.-L. y col., 2013).

El mecanismo por el cual un complejo CIPK-CBL regula un sistema no solo depende de sus propiedades para unir el Ca^{2+} o la especificidad de sustrato, sino también en la especificidad en la combinación de la AtCIPK y la AtCBL (Sanchez-Barrena, M.J. y col., 2013). El análisis de dos estructuras AtCIPK-AtCBL, muestra que unas pocas modificaciones en los aminoácidos pueden controlar la especificidad de la interacción. Esto podría explicar las uniones de forma indiscriminada entre estas proteínas, así como la redundancia en la interacción de ciertas AtCBLs con AtCIPKs específicas (Sanchez-Barrena, M.J. y col., 2013).

Con el objetivo de estudiar la implicación del dominio C-terminal en la regulación postraduccional de AtHAK5, se llevaron a cabo deleciones de dicho dominio. La falta de crecimiento de las células de levadura transformadas con la deleción a partir del residuo 539 (construcción AtHAK5 Δ 539) (Figura 65), podría deberse a la ausencia de proteína en la fracción de membranas totales (Figura 66). El hecho de que el transportador AtHAK5 con la siguiente deleción (AtHAK5 Δ 555) complementara en levadura (Figura 65) y se detectara proteína (Figura 66) sugiere que los aminoácidos localizados entre los residuos 539 y 555 podrían ser esenciales para la síntesis de la proteína o estar implicados en la estabilidad de la misma.

Las construcciones AtHAK5 Δ 555 y AtHAK5 Δ 571 complementaron la pérdida de los sistemas TRK1 y TRK2 en la cepa 9.3, creciendo en condiciones de bajo K^+ y de forma independiente a la presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1 (Figura 65). Sin embargo, la siguiente deleción (AtHAK5 Δ 633) mostró menor actividad del transportador y no mostró activación por AtCIPK23/AtCBL1 (Figura 65). Por tanto, se pensó que el dominio localizado

entre ambos residuos podría actuar en la regulación del transportador de una forma auto-inhibitoria.

Hay que tener en cuenta que en los ensayos de complementación en levadura con AtHAK5 y sus distintas versiones se están sobreexpresando las proteínas, ya que se utilizan plásmidos multicopia con un promotor que produce altos niveles de transcripción de ADN clonado. Esto implica que no toda la proteína de AtHAK5 tiene por qué estar en la membrana plasmática, sino que puede encontrarse en endomembranas. Por tanto, los ensayos de inmunodetección llevados a cabo podrían no reflejar la cantidad de proteína que estaría implicada en la entrada de K^+ a través del transportador AtHAK5 localizado en la membrana plasmática.

Tras lo observado, se formula una hipótesis en la que estaría existiendo un dominio imprescindible para la síntesis o estabilidad de la proteína AtHAK5, comprendido entre los residuos 539 y 555; la existencia de un dominio represor o auto-inhibitorio, entre los residuos 571 y 633, implicado en el mantenimiento del transportador en un estado menos activo; un dominio de activación, necesario para que el complejo AtCIPK23/AtCBL1 lleve a cabo su función sobre AtHAK5; y regiones localizadas en el extremo final del dominio C-t que podrían estar implicadas en la estabilidad de AtHAK5.

En la Figura 79 se ilustra dicha hipótesis, donde se relaciona la actividad observada por cada una de las construcciones con las posibles funciones otorgadas a los fragmentos del dominio C-t. El transportador AtHAK5 silvestre (Figura 79A), se encontraría en un estado de baja actividad en ausencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1 que podría deberse a la presencia de un dominio auto-inhibitorio en el extremo C-t.

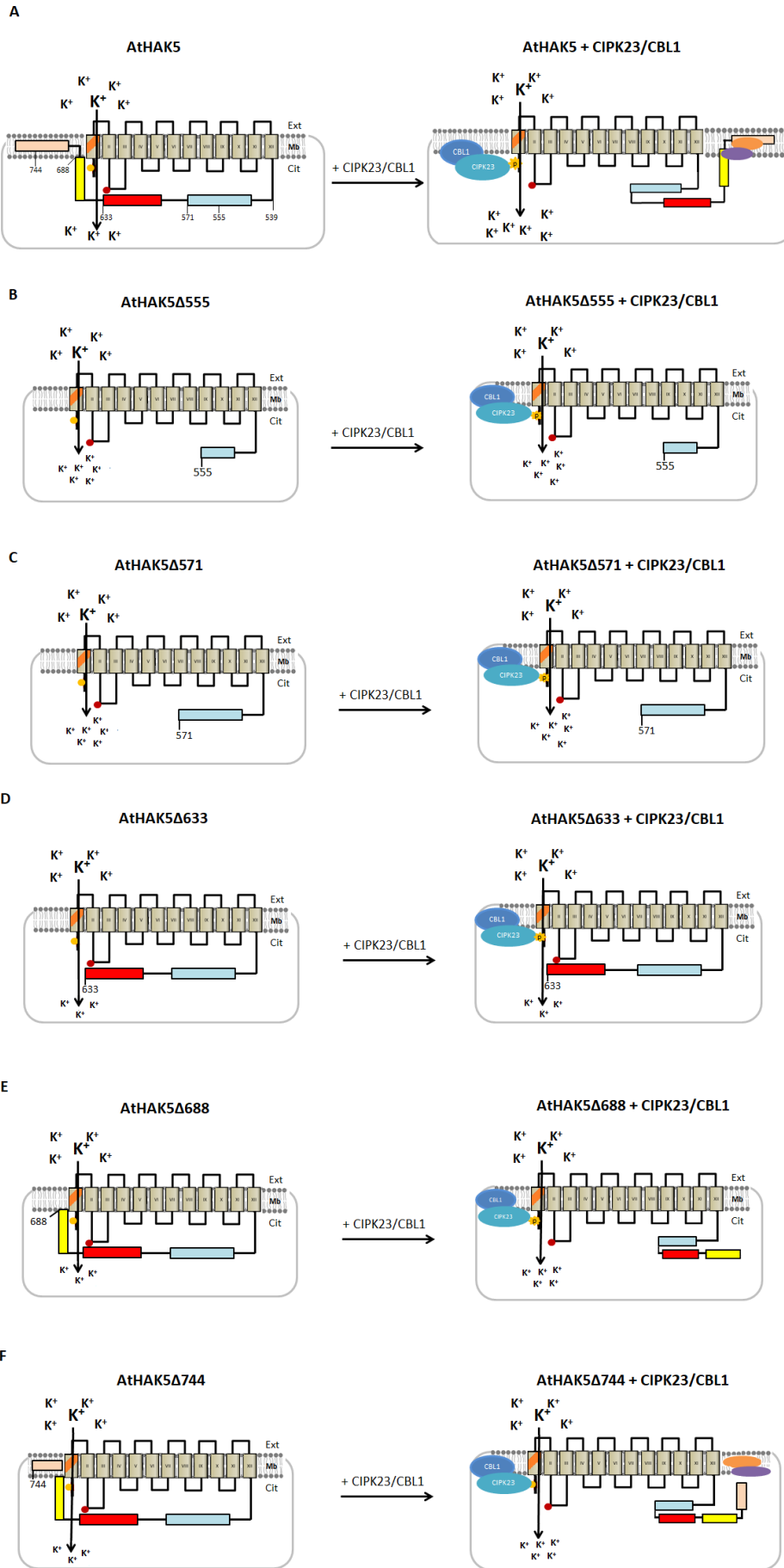


Figura 79. Ilustración de la hipótesis sobre la implicación de los distintos fragmentos del dominio C-terminal de AtHAK5 en la regulación del mismo en ausencia y presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1. A) Transportador AtHAK5 silvestre. B) AtHAK5 Δ 555. C) AtHAK5 Δ 571. D) AtHAK5 Δ 633. E) AtHAK5 Δ 688. F) AtHAK5 Δ 744. El rectángulo azul representa el dominio esencial para la síntesis de la proteína; el rectángulo rojo, el dominio implicado en la represión; el rectángulo amarillo, el dominio de activación necesario para la actuación de AtCIPK23/AtCBL1; el rectángulo naranja claro, representa el extremo final del dominio C-terminal, parte del cual podría estar implicado en la estabilización en la membrana por distintas proteínas, representadas por los círculos naranja y lila. Los círculos azul claro y azul oscuro, representan el complejo AtCIPK23/AtCBL1. El círculo amarillo representa el residuo S35 fosforilado por CIPK23 (Dr. Javier Quintero, comunicación personal) y el círculo rojo, el residuo F130.

Como se ha observado en el apartado 1 del Capítulo 2 de esta memoria de Tesis Doctoral, la activación de AtHAK5 por el complejo dio lugar a una modificación de sus propiedades cinéticas en la absorción de K⁺, obteniéndose unos valores de V_{max} mayores y de K_m menores (Figura 56), acordes con un posible cambio conformacional de la proteína AtHAK5 tras la activación por AtCIPK23/AtCBL1. Siendo así, debería existir un dominio de activación en el extremo C-terminal que estaría implicado en dicha activación, podría estar comprendido entre los residuos 633 y 688, puesto que, en presencia de esta región, la activación de AtHAK5 recupera su dependencia por el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (Figura 65). Este cambio en la conformación de AtHAK5 desencadenaría la pérdida de inhibición por el dominio represor, activándose el transportador.

En el ensayo de fosforilación realizado, se observó que AtCIPK23 estaría fosforilando a AtHAK5 en su dominio N-t (Figura 58). El grupo del Dr. Quintero ha identificado que dicha fosforilación se lleva a cabo sobre residuo de serina localizado en la posición 35 de AtHAK5 (Comunicación personal, datos sin publicar). Como se puede observar en la Figura 80, la sustitución de dicho residuo (S35) por alanina (aminoácido no fosforilable) origina la pérdida de activación de AtHAK5 por el complejo AtCIPK23/AtCBL1.

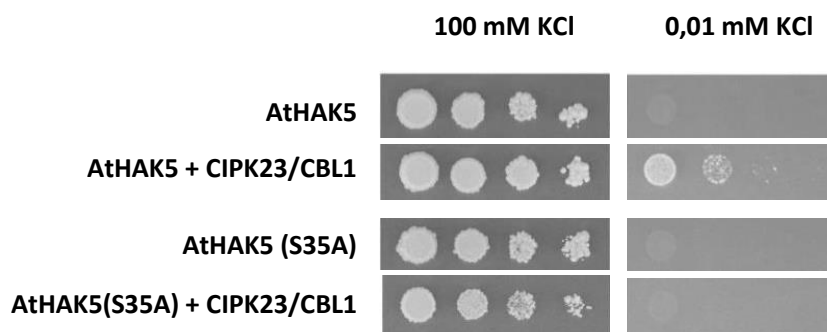


Figura 80. Caracterización funcional del transportador AtHAK5 con la mutación S35A, en ausencia y presencia del complejo AtCIPK23/CBL1. Se muestra el crecimiento en medio PA con distintas concentraciones de K⁺ (100 y 0,01 mM), de células de levadura 9.3 que expresan el AtHAK5 silvestre

Resultados y Discusión: Capítulo 2

(AtHAK5) y el mutante AtHAK5 (S35A), en ausencia o cotransformadas con el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (+ CIPK23/CBL1).

El comportamiento de hiperactividad observado en el crecimiento de las células de levadura con las construcciones AtHAK5 Δ 555 y AtHAK5 Δ 571 (Figura 65) se explicaría porque la pérdida del dominio C-terminal a partir de los residuos 555 y 571 constituiría una conformación del transportador AtHAK5 similar al transportador nativo en presencia de AtCIPK23/AtCBL1, al no poseer los dominios de represión ni ser necesario el cambio conformacional que da lugar a activación (Figura 79B y C, respectivamente). Para profundizar en el estudio de esta hipótesis, se introdujo la mutación S35A en la construcción AtHAK5 Δ 571 (Anexo 6.2) y se llevó a cabo el mismo ensayo de complementación en la levadura 9.3 (Figura 65). La presencia de la mutación S35A en la delección a partir del residuo 571 (AtHAK5 S35A, Δ 571) permitió el crecimiento de la levadura a bajas concentraciones de K⁺ (Figura 81), confirmándose que la delección a partir de este aminoácido es independiente de la presencia de AtCIPK23/AtCBL1 para la activación de AtHAK5.

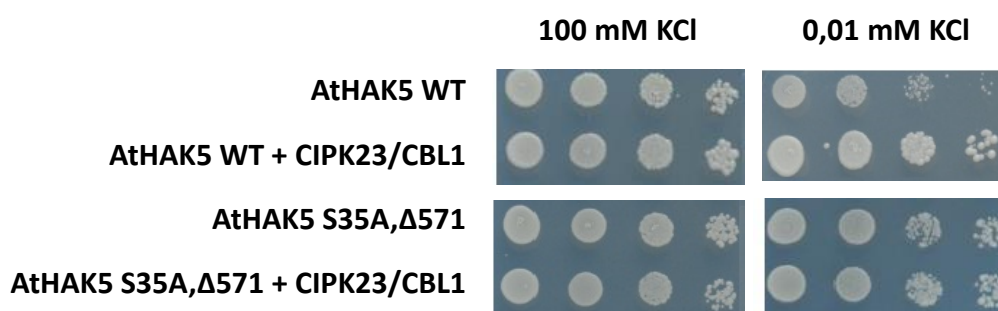


Figura 81. Caracterización funcional del mutante AtHAK5 S35A, Δ 571 en ausencia y presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1. Se muestra el crecimiento en medio PA con distintas concentraciones de K⁺ (100 y 0,01 mM), de células de levadura 9.3 que expresan el AtHAK5 silvestre (AtHAK5) y el mutante AtHAK5 (S35A, Δ 571), en ausencia o cotransformadas con el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (+ CIPK23/CBL1).

La baja actividad mostrada por la construcción AtHAK5 Δ 633 (Figura 65) se debería a la inhibición permanente del transportador por el dominio de represión, que no es liberada por el complejo AtCIPK23/AtCBL1 porque estaría ausente el dominio de activación (Figura 79D). Se consideró que el dominio de represión podría estar regulando el transportador mediante su interacción con el residuo F130 del transportador, localizado en la región citoplasmática denominada 'Internal loop' (IL). Se ha demostrado que la mutación F130S da lugar a una

versión de AtHAK5 muy activa a bajas concentraciones de K⁺ (Aleman, F. y col., 2014). Se formula esta hipótesis porque esta activación de AtHAK5 en el mutante F130S es independiente a la presencia de AtCIPK23/AtCBL1 a bajas concentraciones de K⁺ (Figura 82), comportamiento similar al observado en las deleciones AtHAK5Δ555 y AtHAK5Δ571 (Figura 65).

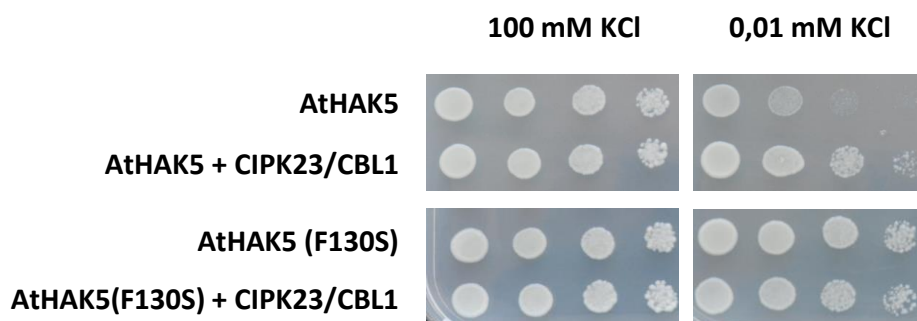


Figura 82. Caracterización funcional del transportador AtHAK5 con la mutación F130S, en ausencia y presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1. Se muestra el crecimiento en medio PA con distintas concentraciones de K⁺ (100 y 0,01 mM), de células de levadura 9.3 que expresan el AtHAK5 silvestre (AtHAK5) y el mutante AtHAK5 (F130S), en ausencia o cotransformadas con el complejo AtCIPK23/AtCBL1 (+ CIPK23/CBL1).

La deleción interna de los aminoácidos desde la posición 572 hasta la 625 originó la pérdida de complementación en levadura a baja concentración de K⁺ (Figura 67), que podría deberse a que la eliminación de una región interna impidiese la correcta conformación de la proteína o la estabilidad de la misma.

Las construcciones AtHAK5Δ688 y AtHAK5Δ744, que presentan los posibles dominios de represión y de activación (Figura 79E y F), presentaron un comportamiento similar al transportador AtHAK5 silvestre, pero una menor activación en la absorción de K⁺ a bajas concentraciones del mismo (Figura 65). Esto sería compatible con que el final del dominio C-terminal estuviera implicado en la estabilidad del transportador en la membrana. En relación a esto, se ha demostrado que la proteína Raf-like quinasa denominada ILK1 (*Integrin-Linked Kinase 1*), interacciona con los dominios C-t de AtHAK5, promoviendo su acumulación en condiciones de deficiencia de K⁺ (Brauer, E.K. y col., 2016). Sería posible por lo tanto que, la menor activación observada en AtHAK5Δ688 y AtHAK5Δ744 respecto a WT, se debiera a la

falta de acumulación de AtHAK5 en la membrana plasmática, mediada por ILK1 (Figura 79E y F).

Por otra parte, se podría considerar que este dominio localizado entre los residuos 572 y 633 estuviese implicado en la regulación del transportador AtHAK5 mediante otro mecanismo que no fuese auto-inhibición. En condiciones de K^+ suficiente, la proteína HAK5 se detecta principalmente en el retículo endoplasmático; mientras que a bajas concentraciones externas de K^+ , estaría localizada en la membrana plasmática ejerciendo su función (Qi, Z. y col., 2008). Numerosos transportadores implicados en la adquisición de distintos nutrientes son regulados a nivel postraducciona l a través de su transporte a la membrana plasmática. Por ejemplo, en condiciones de alto fofato externo, el transportador de fofato (Pi) de alta afinidad, PHT1; 1 se encuentra fosforilado en su dominio C-terminal, lo que origina su retención en el retículo endoplasmático (Bayle, V. y col., 2011).

Tras observar los resultados del ensayo de inmunodetección de AtHAK5 en membranas totales de levadura, no se podría concluir que las diferencias de actividad en la adquisición de K^+ se deban a una mayor o menor cantidad de proteína, puesto que las diferencias en la intensidad de las bandas para las distintas construcciones no se correspondían con las actividades observadas (Figura 66).

La presencia de bandas de gran tamaño en los ensayos de inmunodetección de AtHAK5 con distintas deleciones seriadas de su dominio C-terminal (Figura 68) sugiere la posibilidad de que, al igual que otros canales y transportadores de K^+ , el transportador de alta afinidad AtHAK5 podría formar complejos proteicos. Al observar que la presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1 no era esencial para la presencia de las bandas de gran tamaño (Figura 70), se planteó la posibilidad de que los complejos estuviesen formados por asociaciones de AtHAK5 consigo mismo. Para comprobarlo, se realizó un ensayo de BIFC en hojas de *N. benthamiana*, donde se agroinfiltraron las construcciones correspondientes (AtHAK5::YFP_{C155} y AtHAK5::YFP_{N173}).

Tras demostrar que podría existir interacción AtHAK5-AtHAK5 *in planta* (Figura 71), se procedió a determinar los dominios de AtHAK5 que podrían estar implicados en la interacción; sin embargo, no se observó interacción entre los dominios C-t e IL consigo mismos en el ensayo de Y2H realizado (Figura 73).

Daras, G. y col., (2015) demostraron que el transportador de K⁺ AtKUP4 estaría interaccionando consigo mismo formando homodímeros. En el ensayo de doble híbrido publicado por (Daras, G. y col., 2015), al comprobar si el dominio C-t de una subunidad AtKUP4 interaccionaba con el otro C-t, y si el dominio IL, también presente en AtKUP4, interaccionaba con el dominio IL de otra subunidad, el resultado fue negativo para la interacción. Sin embargo, cuando estos autores realizaron el ensayo con distintas deleciones de dichos dominios C-t e IL, observaron que había interacción cuando se eliminaban las regiones relativamente hidrofóbicas presentes en los mismos. Es decir, el dominio C-t de una subunidad AtKUP4 estaría interaccionando con el dominio C-t de la otra subunidad AtKUP4, pero en esta interacción no participa la región hidrofóbica presente en el dominio C-t. Y lo mismo ocurre con el dominio IL. De igual forma que se describe para el transportador AtKUP4, al realizar el ensayo de Y2H en AtHAK5, la naturaleza hidrofóbica de la región comprendida entre los aminoácidos 540 y 600 del dominio C-t, y entre los residuos 123 y 140 del dominio IL (Figura 83), podría estar interfiriendo en la interacción de las regiones hidrofílicas implicadas en la posible formación de complejos, lo que podría estar impidiendo la interacción de los dominios completos en el ensayo de Y2H realizado (Figura 73).

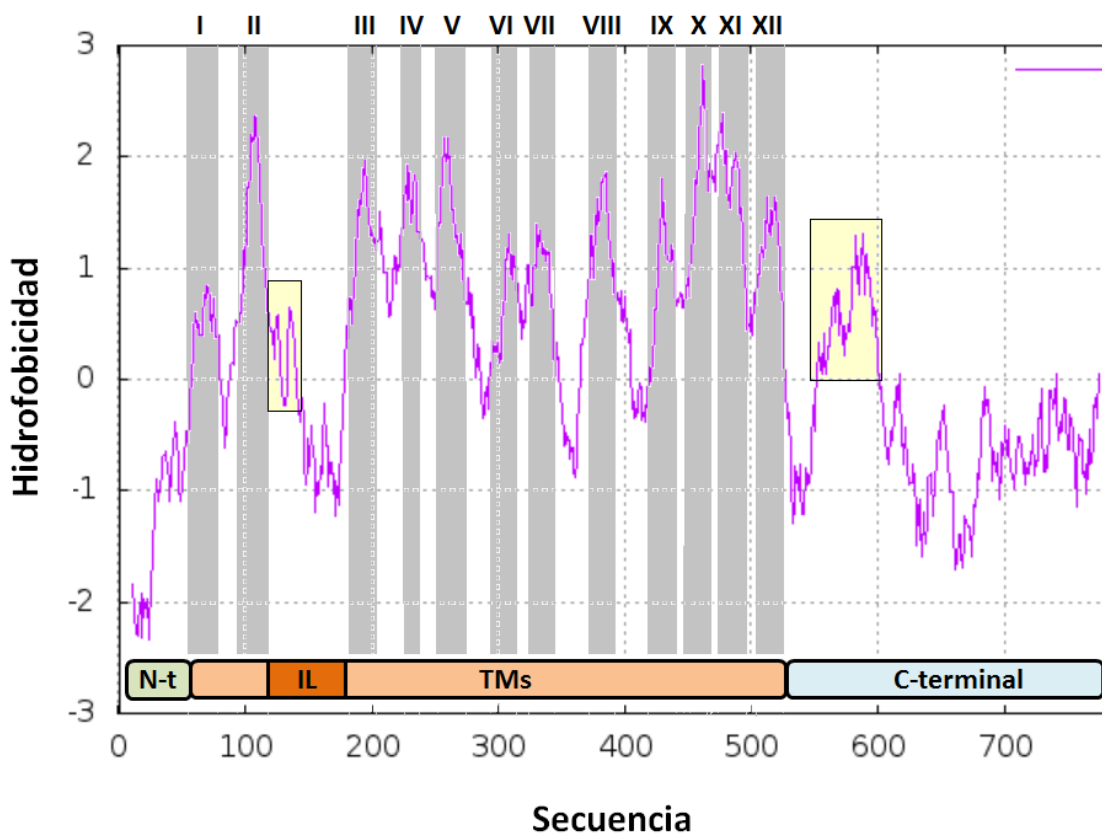


Figura 83. Gráfica de hidrofobicidad de la secuencia proteica de AtHAK5. Se indican los distintos dominios: region N-terminal (N-t), residuos 1 al 60; los 12 segmentos transmembrana (TMs), sombreados en gris cada segmento, del I al XII; la región '*Internal Loop*' (IL), residuos 123 al 185; y el dominio C-terminal, del residuo 529 al 785. En amarillo se indican las regiones relativamente hidrofóbicas localizadas en el dominio IL, desde el residuo 123 al 140; y en el C-t, desde aproximadamente el residuo 540 hasta el 600. Gráfica realizada con la herramienta ProScale, modelo Kyte & Doolittle, utilizando un intervalo de 21 aminoácidos (método por defecto).

En la Figura 84, se muestra la hipótesis de interacción de AtHAK5 consigo mismo para la formación de un homodímero teniendo en cuenta las regiones hidrofóbicas presentes en cada dominio.

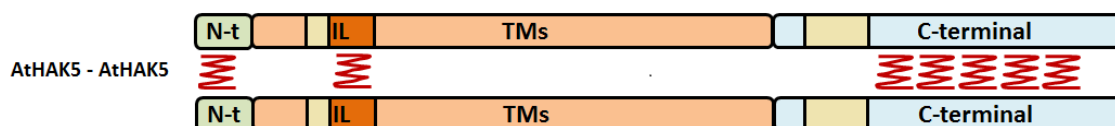


Figura 84. Hipótesis de la interacción de AtHAK5 consigo mismo en la formación de un homodímero. N-t representa el dominio N-terminal de AtHAK5; IL, indica el dominio denominado '*Internal Loop*'; TMs hace referencia a los dominios transmembrana; y C-terminal, al dominio C-terminal de AtHAK5. Las zonas amarillas señalan las regiones hidrofóbicas dentro de los dominios IL y C-terminal. El símbolo en rojo indicaría la interacción entre los dominios. A diferencia de la Figura 72, esta hipótesis considera que las regiones hidrofóbicas presentes en los distintos dominios no estarían participando en la interacción.

En los ensayos de inmunodetección, se observó que las bandas de gran tamaño que podrían corresponderse a complejos proteicos eran menos intensas en las deleciones realizadas a partir de los aminoácidos 555 (AtHAK5 Δ 555) y 571 (AtHAK5 Δ 571) (Figuras 68 y 70). De acuerdo con la hipótesis formulada (Figura 84), la menor estabilidad observada en estas deleciones se explicaría por la ausencia de las regiones del dominio C-terminal implicadas en la interacción para la formación de homómeros (Figura 85).

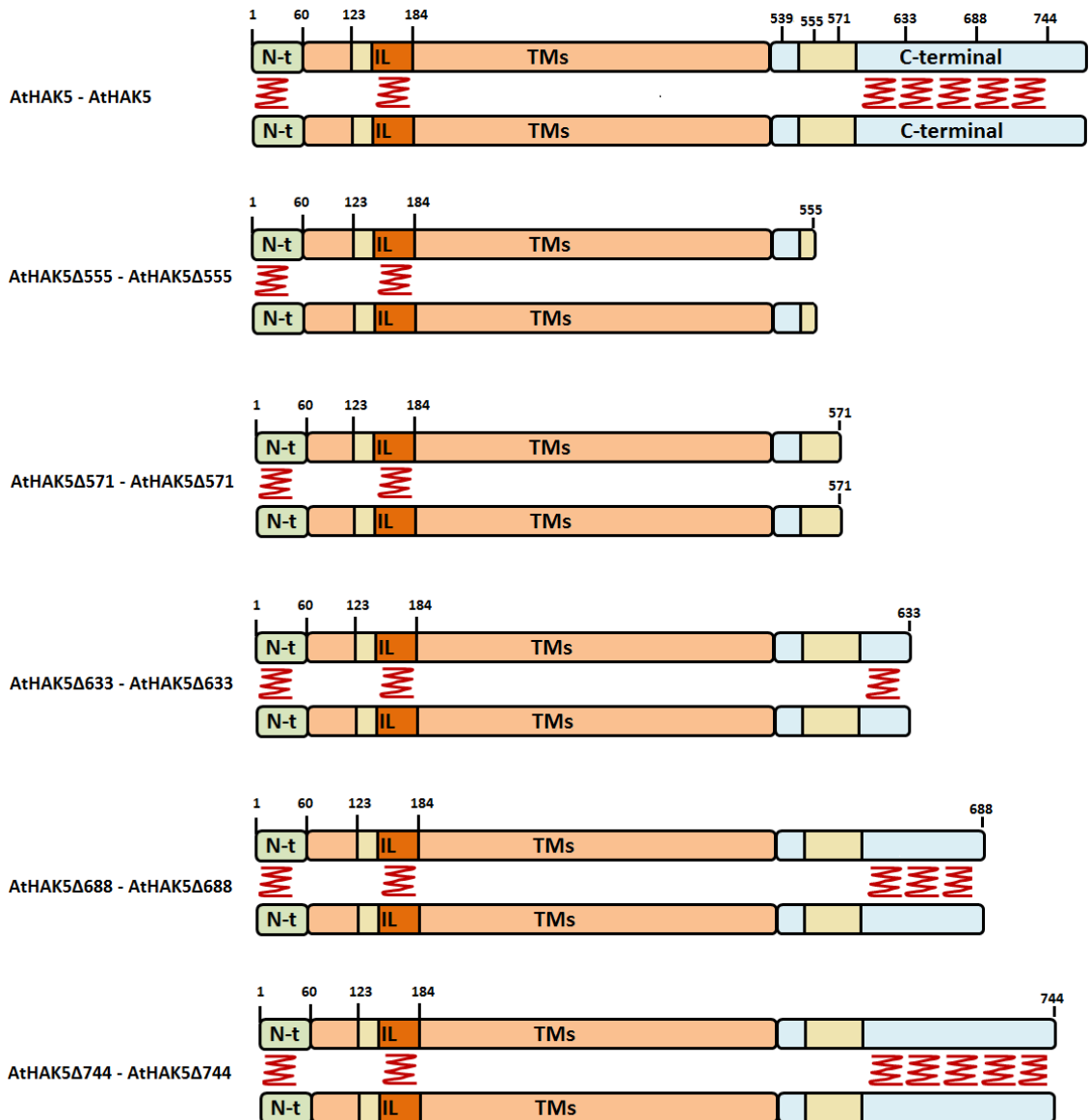


Figura 85. Hipótesis de la interacción de AtHAK5 con las distintas delecciones en el dominio C-terminal en la formación de homodímeros. N-t representa el dominio N-terminal de AtHAK5; IL, indica el dominio denominado 'Internal Loop'; TMs hace referencia a los dominios transmembrana; y C-terminal, al dominio C-terminal de AtHAK5. Las zonas amarillas señalan las regiones hidrofóbicas dentro de los dominios IL y C-terminal. El símbolo en rojo indicaría la interacción entre los dominios. Esta hipótesis considera que las regiones hidrofóbicas presentes en los distintos dominios no estarían participando en la interacción.

En el alineamiento de las secuencias de proteínas de distintos transportadores de la familia HAK/KUP/KT (Figura 86), se puede observar que las regiones de AtHAK5 que podrían estar implicadas en la formación de homodímeros no se encuentran conservadas en los distintos transportadores de la misma familia, siendo las regiones hidrofóbicas (señaladas en amarillo), las regiones que presentan mayor grado de conservación. La variabilidad en estas

Resultados y Discusión: Capítulo 2

regiones tendría como objeto prevenir la formación de heterómeros entre los miembros de la misma familia, siendo así zonas selectivas para la formación de homómeros.

Antes de descartar que no haya interacción entre los dominios C-t e IL entre sí mismos, como indica el ensayo Y2H realizado en esta memoria de Tesis Doctoral, se deberá llevar a cabo un ensayo de Y2H teniendo en cuenta las regiones hidrofóbicas de cada dominio.

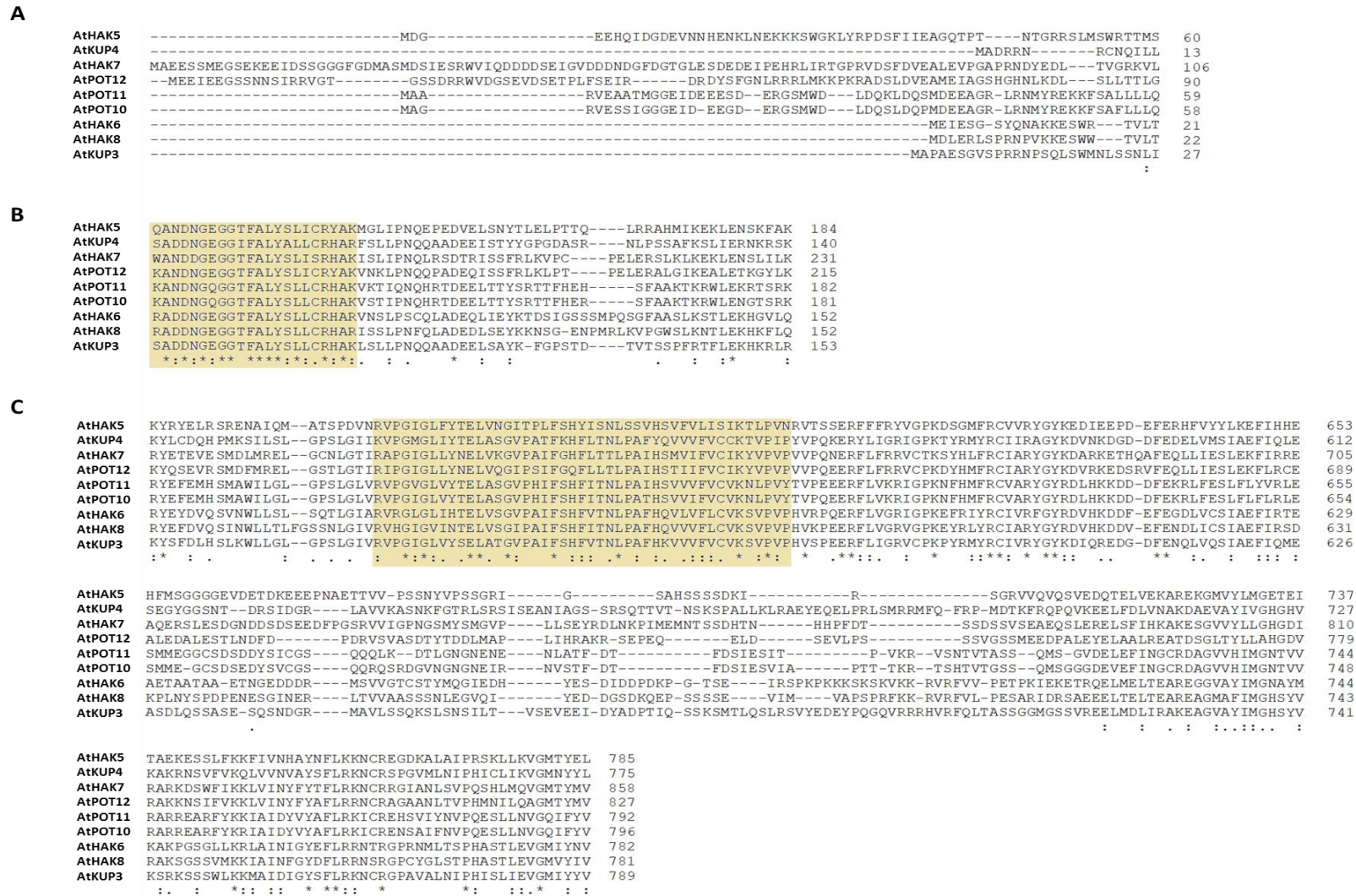


Figura 86. Alineamiento de las secuencias de proteínas de distintos transportadores de K⁺ de la familia HAK/KUP/KT de Arabidopsis. Se muestran las secuencias correspondientes a los dominios citoplasmáticos N-terminal (A), 'Internal Loop' (B) y el extremo C-terminal (C), de la secuencia de AtHAK5, alineados con las secuencias de distintos transportadores de la familia HAK. En amarillo, los residuos de carácter hidrofóbico de AtHAK5 dentro de los dominios IL y C-terminal, según la herramienta ProScale.

Resultados y Discusión: Capítulo 2

En la región TM1 de los transportadores de la familia HAK/KUP/KT se ha encontrado un motivo altamente conservado (GxxGYGD) (Figura 74) que presenta gran similitud al dominio poro descrito en los canales de K⁺ (GYGD). Los residuos de carácter ácido transmembrana esenciales para la absorción de K⁺ por el transportador EckKUP (Sato, Y. y col., 2014) también se encuentran conservados a lo largo de la familia HAK/KUP/KT. En este apartado se ha llevado a cabo la mutación de estos residuos de AtHAK5 para analizar su relevancia funcional.

La pérdida de función del transportador AtHAK5 cuando estos residuos se sustituyen por alanina (Figuras 75 y 76), no estaría causada por la ausencia de proteína de membrana (Figura 78), por lo que podría relacionarse con la adquisición de K⁺.

Las mutaciones en los residuos G74A, S76A y P77A sin embargo, resultaron en versiones de AtHAK5 más activas en la adquisición de K⁺ en condiciones de bajo K⁺, de forma independiente a la presencia del complejo AtCIPK23/AtCBL1 (Figuras 75 y 76). Mackinnon, R., (2003) estableció que la glicina conservada en la hélice a continuación del dominio poro en los canales de K⁺ actuaría de bisagra, permitiendo el cierre y el bloqueo del canal. Esta glicina, que se encuentra conservada en los transportadores de la familia HAK/KUP/KT (Figura 87), podría estar actuando de igual forma en el transportador AHAK5, mediante su interacción con los residuos dispuestos a continuación del posible motivo poro. De esta forma, la sustitución de estos residuos por alanina (aminoácido sin cadena lateral) no permitiría que se produjese la interacción del residuo original con la glicina mencionada, impidiéndose el cierre del dominio poro, lo que llevaría a la actuación del transportador de forma permanente.

```

EckKUP    --NKQSLPAITLAAIGVVYGDIGTSPLYTLRECLSGQFGFVERDAVFGFLSLIFWLLIFVVS IKYLT FVMRADNAGE    80
AtHAK5    WR---TTMSLAFQSLGVVYGDIGTSPLYVYASTFTDGIN---KDDVVGVLSLIIYITITLVALLKYVFIVLQANDNGE    126
HvHAK1    WM---RTLSLAFQSVGIIYGDIGTSPLYVYSSTFPDGIKN---RDDLVGVLSLILYTLIIIPMLKYVFIVLYANDNGD    113
OsHAK1    WA---VTLHLAFQSVGIIYGDIGTSPLYVYSSTFPDGIGH---RDDLVGVLSLILYTLIIIPMLKYVFIVLYANDNGD    123
CaHAK1    WK---TVLSLAFQSVGVIYGDIGTSPLYVFASTFTDKIGH---KDDLVGVLSLIIYITITLVPMTKYVFIVLWANNNGD    127
AtHAK8    WW---TVLTLAYQSLGVVYGDIGTSPLYVYKSTFAEDITHSETNEEIFGVLSLIFWTLTLIPLVKYVFIVLRADDNGE    91
AtKUP3    WMNLSNLIILAYQSFVVYGDIGTSPLYVFPSTFIGKLHKHHNEDAVFGAFSLIFWTLTLIPLKYLVLVLSADDNGE    96
AtKUP6    WR---TVLTLAYQSLGVVYGDIGTSPLYVYKSTFAEDIHHSNEEIFGVLSLIFWTLTLIPLVKYVFIVLRADDNGE    90
AtKUP10   KFSAFLLQLSFQSLGVVYGDIGTSPLYVYNTFPRGIKD---PEDIIGALSIIYSLTLIPLKYLIVVCKANDNGQ    124
AtKUP11   KFSALLLQLSFQSLGVVYGDIGTSPLYVYNTFPHGIKD---PEDIIGALSIIYSLTLIPLKYLIVVCKANDNGQ    125
AtKUP12   --SLTTLGIAFQTLGVVYGDIGTSPLYVFSDFVSKVP---IRSEVDVLGALSIIYSLTLIPLKYLIVVCKANDNGE    157
          .*::***:.  ****.  :          :.* :*::: : ..  * : .  *:: *

```

Figura 87. Alineamiento de secuencias de proteínas de la región TM1 de transportadores de la familia HAK de distintas especies. En amarillo se muestra el motivo conservado, que guarda similitud con el motivo GYGD, dominio poro descrito en canales de K⁺. En azul, la glicina conservada que podría interactuar con los residuos adyacentes al posible dominio poro en AtHAK5.

Futuras determinaciones basadas en el estudio del resto de aminoácidos presentes en estos dominios, así como en la glicina conservada que podría estar implicada en la apertura y cierre del dominio poro en el transportador AtHAK5, permitirían profundizar en la identificación y caracterización de los aminoácidos esenciales para reconocimiento y unión del K^+ por el transportador AtHAK5.

CAPÍTULO 3:

**PAPEL DEL TRANSPORTADOR SIHAK5 EN LA
ABSORCIÓN DE Cs⁺ EN PLANTAS DE TOMATE.**

La presencia de ion cesio (Cs^+) a altas concentraciones, rango milimolar, en la solución del suelo, puede llegar a ser tóxica para las plantas, ya que el Cs^+ afecta a ciertos procesos bioquímicos que llevan a la necrosis de los tejidos (White, P.J. y Broadley, M.R., 2000). Cuando el Cs^+ está presente en el exterior a bajas concentraciones, en el rango micromolar, también puede acumularse en la planta, aunque no produce toxicidad en la misma. Sin embargo, cuando se trata de radiocesio, puede terminar afectando la salud animal y humana a través de la cadena alimenticia.

Para reducir los efectos tóxicos del Cs^+ y minimizar su entrada a la cadena alimenticia, se pueden abordar dos estrategias basadas en las plantas: la recuperación de suelos mediante fitoremediación utilizando plantas con una gran capacidad para acumular el Cs^+ (Sharma, S. y col., 2015) o la reducción de acumulación de Cs^+ en las plantas al disminuir su capacidad para absorber el Cs^+ (White, P.J. y Broadley, M.R., 2000). Para poder llevar a cabo estas estrategias sería necesaria la identificación y caracterización de los mecanismos implicados en la absorción, translocación y movilización del Cs^+ a través de la planta.

Por ser un catión similar al K^+ , el Cs^+ compite con éste en su unión a determinados transportadores de K^+ , es decir, muchos sistemas de transporte de K^+ son permeables al Cs^+ (Véry, A.-A. y col., 2014). De acuerdo con esto, se ha descrito que el Cs^+ provoca la inhibición de la absorción de K^+ (Adams, E. y col., 2013; White, P.J. y Broadley, M.R., 2000; Epstein, E. y Hagen, C.E., 1952; Maathuis, F.J. y Sanders, D., 1996; Sheahan, J.J. y col., 1993a). Se han identificado varias rutas de absorción de Cs^+ en *Arabidopsis* (Caballero, F. y col., 2012; Genies, L. y col., 2017), *Riccia fluitans* (Heredia, M.A. y col., 2002) y arroz (Nieves-Cordones, M. y col., 2017). Estos estudios apuntan a que NSCCs y transportadores del tipo HAK podrían ser los responsables de la absorción de Cs^+ de baja y alta afinidad, respectivamente.

Mientras que en *Arabidopsis* existen varios estudios sobre los sistemas de absorción de Cs^+ , en tomate apenas existe información. En este capítulo se presenta un estudio sobre los mecanismos moleculares implicados en la absorción de Cs^+ en plantas de tomate.

1- EFECTO DE LA PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE Cs⁺ SOBRE LA ABSORCIÓN DE K⁺ DE ALTA AFINIDAD.

Estudios previos en Arabidopsis han mostrado que la presencia de Cs⁺ en el medio de cultivo da lugar a plantas de menor tamaño, deficientes de K⁺ y a una inducción del transportador de alta afinidad AtHAK5 en condiciones de K⁺ suficiente (Adams, E. y col., 2013).

En este apartado, se estudian los efectos de la presencia de Cs⁺ en la solución externa sobre la absorción de K⁺ por parte de las raíces de plantas de tomate.

En primer lugar, se llevó a cabo un experimento preliminar para ver los efectos que producía sobre la planta de tomate, la presencia de concentraciones de 0,05 y 1 mM Cs⁺ en el medio externo. En condiciones de K⁺ suficiente (1,4 mM) se observó toxicidad en presencia de 1 mM de Cs⁺ (Figura 88), y así se utilizó esta concentración en el siguiente experimento.

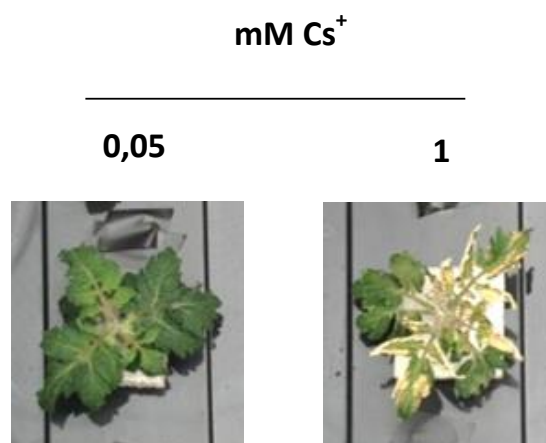


Figura 88. Parte aérea de plantas de tomate de 21 días de edad, tratadas durante los últimos 7 días en presencia de 1,4 mM de K⁺ y de 0,05 y 1 mM de Cs⁺.

1.2-EFECTO SOBRE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE K⁺.

Se germinaron semillas de tomate variedad Micro-Tom en las condiciones detalladas en MyM, apartado 1.3.1.1.1 y se cultivaron durante 15 días en solución nutritiva 1/5 de Hoagland modificada (MyM, apartado 1.3.1.1.1). Transcurrido este tiempo, se transfirieron a la misma SN en ausencia (+ K⁺) y presencia de 1 mM de Cs⁺ (+ K⁺ + 1 mM Cs⁺), durante 7 días.

Con el fin de comprobar si estas plantas presentaban capacidad de absorber K^+ en el rango de alta afinidad, se realizó un experimento para medir la desaparición de K^+ presente en una solución externa con $50 \mu M$ de K^+ (MyM, apartado 2.1.2.2.2). La tasa de flujo de absorción de K^+ (Figura 89) se calculó como la variación en la concentración de K^+ en la solución externa, por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo.

Como se observa en la Figura 89, las plantas tratadas durante 7 días con K^+ suficiente y 1 mM de Cs^+ no mostraron absorción de K^+ , por lo que la presencia de Cs^+ no indujo la capacidad de absorción de K^+ de alta afinidad en raíces de plantas de tomate.

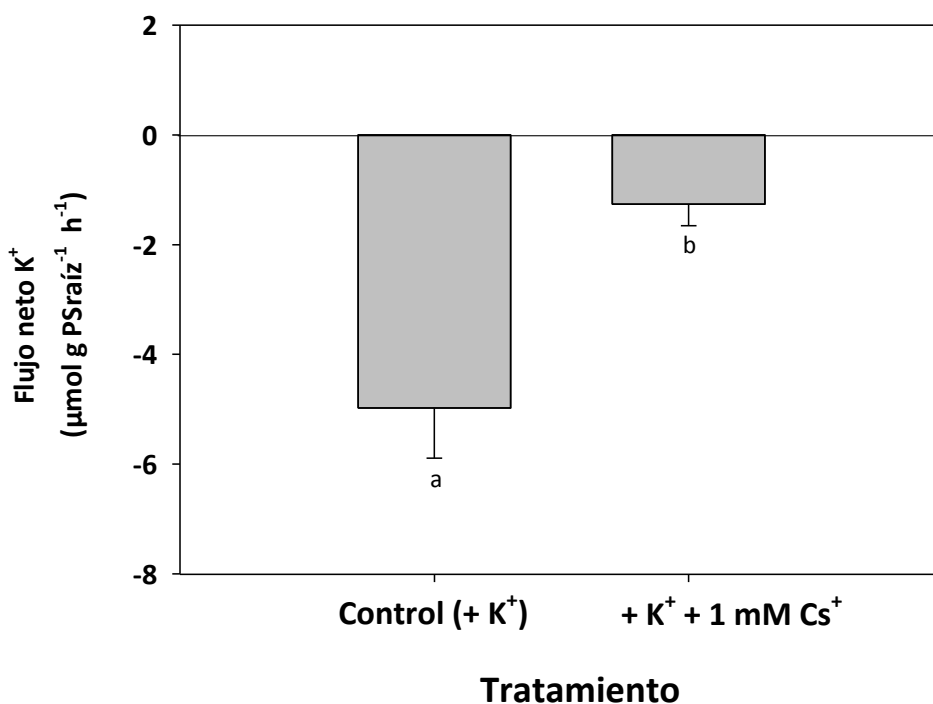


Figura 89. Tasa de flujo de K^+ de una solución externa con $50 \mu M$ de K^+ por las raíces de plantas de tomate tratadas durante 7 días en ausencia o presencia de 1 mM de Cs^+ . Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con letras diferentes indican diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

1.3- EFECTO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE K⁺.

Las plantas utilizadas en el experimento de absorción de K⁺ descrito anteriormente fueron utilizadas para su análisis mineral. Tras determinar las concentraciones de los minerales presentes en el material vegetal (MyM, apartado 2.1.2.2.2), se observó que las plantas tratadas con Cs⁺ presentaban menor concentración de K⁺, tanto en la raíz como en la parte aérea (Figura 90). Este efecto fue más evidente en raíces, donde la concentración de K⁺ se redujo en un 47 %. Además, acumularon Cs⁺ en ambos tejidos, aproximadamente 0,2 mmol g⁻¹ de peso seco (Figura 90).

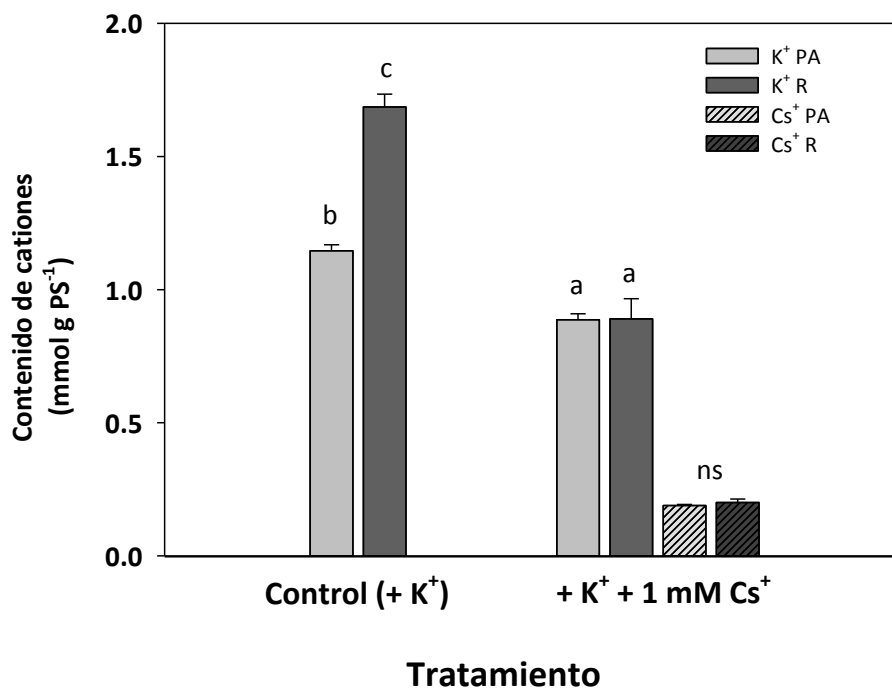


Figura 90. Contenido de K⁺ y de Cs⁺ en la raíz y la parte aérea de plantas de tomate tratadas durante 7 días en ausencia o presencia de 1 mM de Cs⁺. Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con diferentes letras indican diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey. 'ns' indica 'no significativo'.

1.4- EFECTO SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE *SIHAK5*.

Se estudió la respuesta del gen *SIHAK5* en las plantas de tomate sometidas a los mismos tratamientos descritos anteriormente. Al igual que se ha descrito en los ensayos anteriores, se

extrajo el ARN de raíces, se sintetizó el ADNc correspondiente y se analizó la expresión de *SIHAK5* mediante RT-qPCR, de igual forma a la descrita anteriormente, utilizando el gen *SIEF-1α* como gen de referencia.

No se observó inducción de la expresión del gen *SIHAK5* en plantas cultivadas en presencia de Cs^+ y K^+ suficiente (Figura 91).

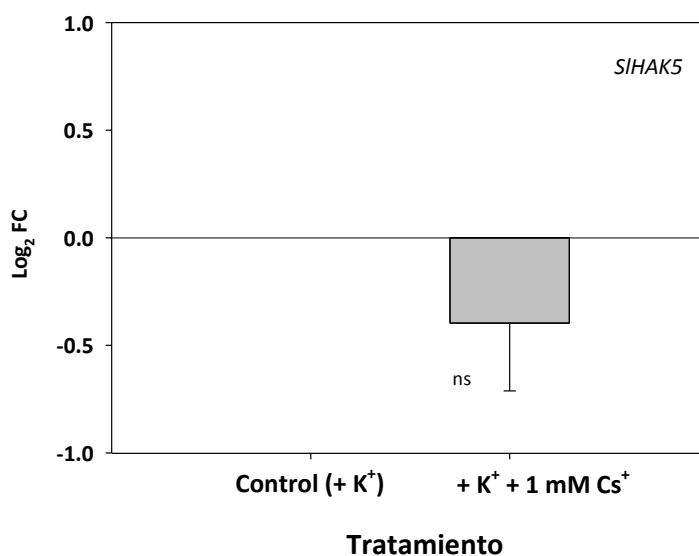


Figura 91. Expresión del gen *SIHAK5* en raíces de plantas de tomate tratadas durante 7 días en condiciones de K^+ suficiente y presencia o ausencia de Cs^+ , mediante PCR en tiempo real. Los niveles de expresión se muestran como el Log_2 FC de *SIHAK5* en las muestras tratadas respecto a las muestras control (crecidas en la solución nutritiva completa) según el método comparativo de C_T . Se muestra la media de 3 repeticiones. 'ns' indica 'no significativo' a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

2- ABSORCIÓN DE Cs⁺ EN EL RANGO DE BAJA AFINIDAD.

Los resultados obtenidos en el apartado anterior muestran que las plantas cultivadas en presencia de Cs⁺ a una concentración de 1 mM, acumulan este catión en la raíz y en la parte aérea (Figura 90). Por tanto, debe existir un mecanismo mediante el cual se absorbe el Cs⁺ en presencia de K⁺. Se ha propuesto que la absorción de Cs⁺ puede llevarse a cabo en las plantas de Arabidopsis por el transportador HAK5 o por NSCCs (Broadley, M. y col., 2001; Caballero, F. y col., 2012). Como el gen *SIHAK5* no se indujo en las condiciones experimentales anteriores (Figura 91), se estudió si los NSCC podrían ser los responsables de la absorción de Cs⁺ en estas condiciones.

Broadley, M. y col., (2001) observaron que el Ca²⁺ podría competir con otros sustratos de los NSCC, como por ejemplo el Cs⁺. Por este motivo, se realizó un experimento con el objeto de estudiar si la presencia de Ca²⁺ afectaba a la acumulación de Cs⁺ en plantas de tomate. Se cultivaron las plantas durante 15 días en solución 1/5 de Hoagland modificada y posteriormente se trataron durante 7 días en presencia o ausencia de 1 mM Cs⁺ y distintas concentraciones de Ca²⁺ (Tabla 50).

Tabla 50. Concentraciones de K⁺, Ca²⁺ y Cs⁺ en las soluciones utilizadas para los distintos tratamientos.

*El Ca²⁺ se añadió en forma de Ca (NO₃)₂·4H₂O y de Ca (H₂PO₄)₂·H₂O hasta 1,5 mM y el resto hasta 10 mM en forma de CaCl₂; el Cs⁺ se añadió en forma de CsCl.

Tratamiento *	K⁺ (mM)	Ca²⁺ (mM)	Cs⁺ (mM)
Control	1,4	1,5	0
0,8 Ca + 1 Cs⁺	1,4	0,8	1
1,5 Ca + 1 Cs⁺	1,4	1,5	1
10 Ca + 1 Cs⁺	1,4	10	1

Cuando el Ca²⁺ estaba presente a altas concentraciones en la solución nutritiva con 1 mM de Cs⁺ disminuyeron los síntomas de toxicidad y la acumulación de este catión en la raíz y en la parte aérea (Figura 92). Estas plantas también presentaron mayores pesos frescos (Figura 92B) y menores concentraciones de Cs⁺ en la raíz y en la parte aérea (Figura 92C), mientras que las concentraciones de K⁺ no se vieron afectadas (Figura 92D). Por tanto, se deduce que el sistema implicado en la absorción de Cs⁺ en el rango de concentración milimolar y en presencia de K⁺ sería sensible a Ca²⁺.

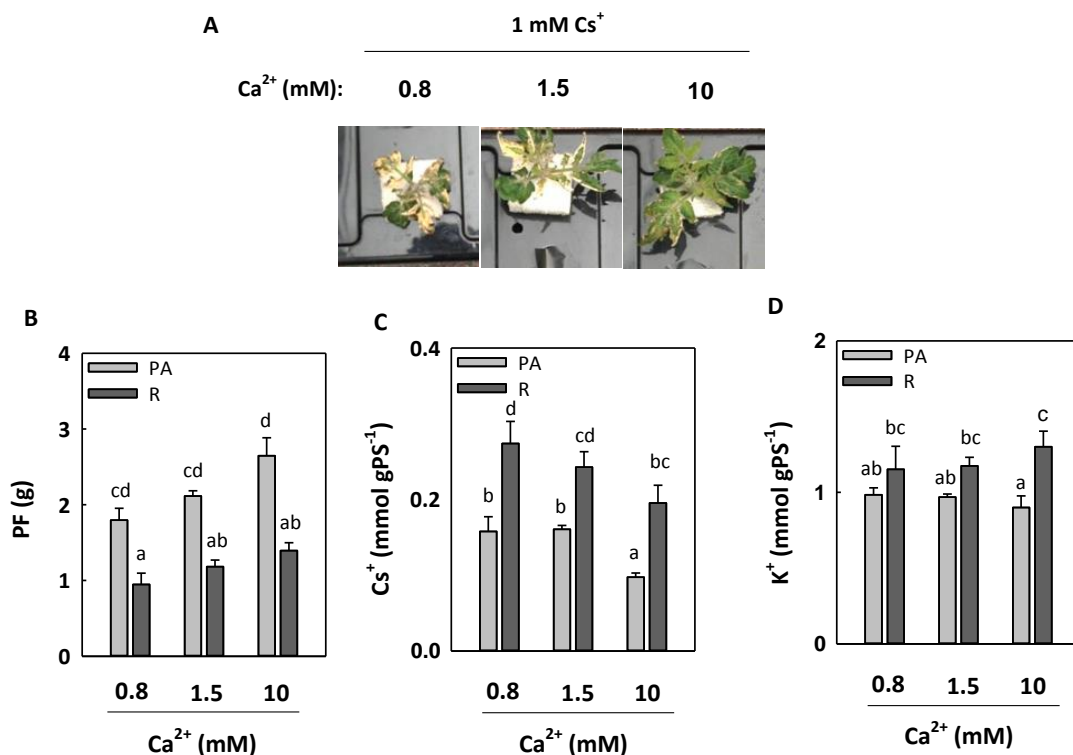


Figura 92. Efecto del Ca²⁺ en la acumulación de Cs⁺ en plantas de tomate crecidas en K⁺. A) Fotografía de plantas de tomate crecidas durante 15 días en solución nutritiva completa y tratadas durante 7 días en presencia de K⁺, 1 mM de Cs⁺ y distintas concentraciones de Ca²⁺ (0,8, 1,5 y 10 mM). Pesos frescos (B), concentraciones de Cs⁺ (C) y concentraciones de K⁺ (D) de raíz y parte aérea de plantas de tomate cosechadas al final de los tratamientos. Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con letras diferentes indican diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

3- ABSORCIÓN DE Cs⁺ EN EL RANGO DE ALTA AFINIDAD.

En este apartado se muestra un estudio realizado en plantas de tomate tratadas en presencia y ausencia de K⁺ y de distintas concentraciones de Cs⁺ en el rango micromolar (Tabla 51). Las plantas se crecieron durante 15 días en SN Hoagland modificada completa y posteriormente se sometieron a 7 días en los tratamientos descritos en la Tabla 51.

Tabla 51. Concentraciones de K⁺ y Cs⁺ presentes en la SN para los distintos tratamientos. *El K⁺ se añadió en forma de KCl y el Cs⁺ en forma de CsCl.

Tratamiento *	K⁺ (mM)	Cs⁺ (μM)
Control	1,4	0
+ K⁺ + 12,5 Cs⁺	1,4	12,5
+ K⁺ + 25 Cs⁺	1,4	25
+ K⁺ + 50 Cs⁺	1,4	50
- K⁺	0	0
- K⁺ + 12,5 Cs⁺	0	12,5
- K⁺ + 25 Cs⁺	0	25
- K⁺ + 50 Cs⁺	0	50

Las plantas crecidas con K⁺ presentaron menor acumulación de Cs⁺, mientras que en las plantas ayunadas de K⁺ las concentraciones internas de Cs⁺ fueron superiores (Figura 93). La raíz acumuló más Cs⁺ que la parte aérea (Figura 93), y presentó concentraciones similares a las de las plantas crecidas con K⁺ y 1 mM de Cs⁺ (Figura 92C). Estos resultados indican que la deficiencia de K⁺ parece estar induciendo un sistema que permite la absorción de Cs⁺ a concentraciones micromolares.

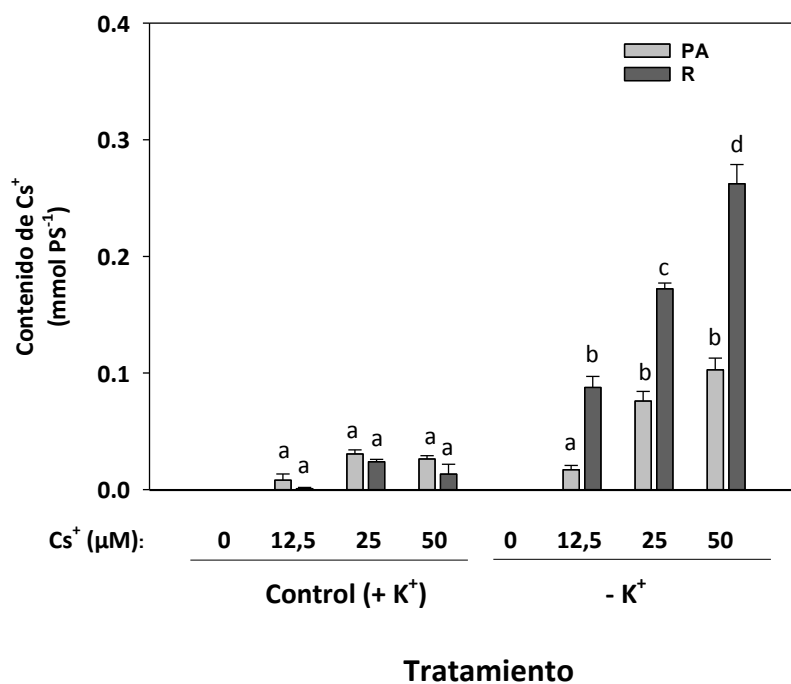


Figura 93. Contenido de Cs^+ en la raíz y la parte aérea de plantas de tomate tratadas durante 7 días en presencia o ausencia de K^+ y presencia de distintas concentraciones de Cs^+ . Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con diferentes letras indican diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

Con el fin de investigar este sistema, se llevó a cabo un experimento de desaparición de Cs^+ presente en una solución externa, como se ha descrito previamente para el K^+ . Se utilizaron plantas crecidas durante 7 días en SN completa, y tratadas durante 7 días en presencia o ausencia de K^+ . Se transfirieron a recipientes que contenían $50 \mu\text{M}$ de CsCl y se tomaron muestras de esta solución externa cada 15 minutos durante 3 horas. Se midieron las concentraciones de Cs^+ de las muestras de solución externa y se representaron frente al tiempo (Figura 94).

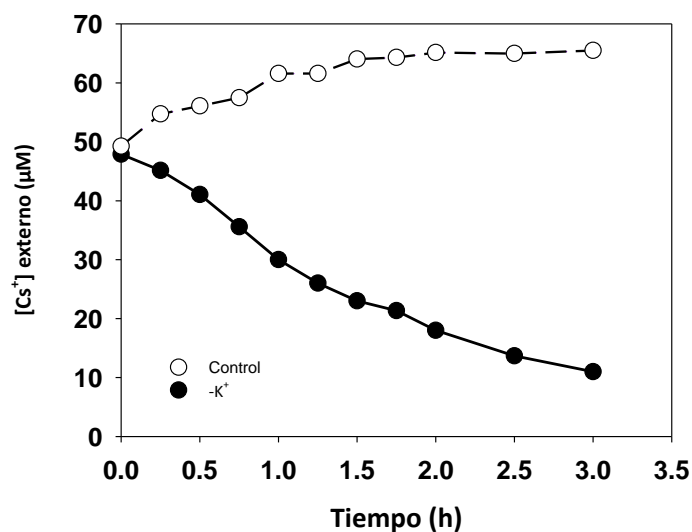


Figura 94. Curvas de desaparición de Cs⁺ de una solución externa con raíces de plantas de tomate ayunadas de K⁺. Las plantas crecidas en solución nutritiva completa (control) se ayunaron de K⁺ (círculos negros) o siguieron en la solución control (círculos blancos) durante 7 días. Posteriormente se transfirieron a una solución nutritiva completa con 50 µM de Cs⁺ de la que se tomaron muestras a distintos tiempos para medir la concentración de Cs⁺. Se representan las concentraciones de Cs⁺ de la solución externa a las raíces frente al tiempo.

Las raíces de las plantas crecidas en presencia de K⁺ no daban lugar a la desaparición del Cs⁺ externo, mientras que las de las plantas ayunadas de K⁺ sí, agotando el Cs⁺ externo hasta una concentración de 10 µM en 3 horas, compatible con una absorción de Cs⁺ de alta afinidad (Figura 94).

Se calcularon los flujos de Cs⁺ a partir de los contenidos de Cs⁺ de la solución externa entre dos puntos de la curva de desaparición por gramo de peso fresco de raíz por hora (Figura 95). Además, estos experimentos se repitieron añadiendo 1 mM de NH₄⁺ (inhibidor del transportador HAK5) a la solución externa que contenía 50 µM de Cs⁺, y se observó que la absorción de Cs⁺ se inhibió completamente (Figura 95A). Sin embargo, cuando el experimento se realizaba en presencia de 1 mM de Ba²⁺ (bloqueante de canales de K⁺ y de NSCC) no se afectó la absorción de Cs⁺ (Figura 95A). La presencia de altas concentraciones de Ca²⁺ en la solución externa tampoco afectó a la absorción de Cs⁺ en el rango de alta afinidad (Figura 95B). Las plantas sometidas a estas mismas condiciones se emplearon para llevar a cabo experimentos de flujo de K⁺ observándose un mismo comportamiento que en el caso del Cs⁺ (Figura 95 C y D).

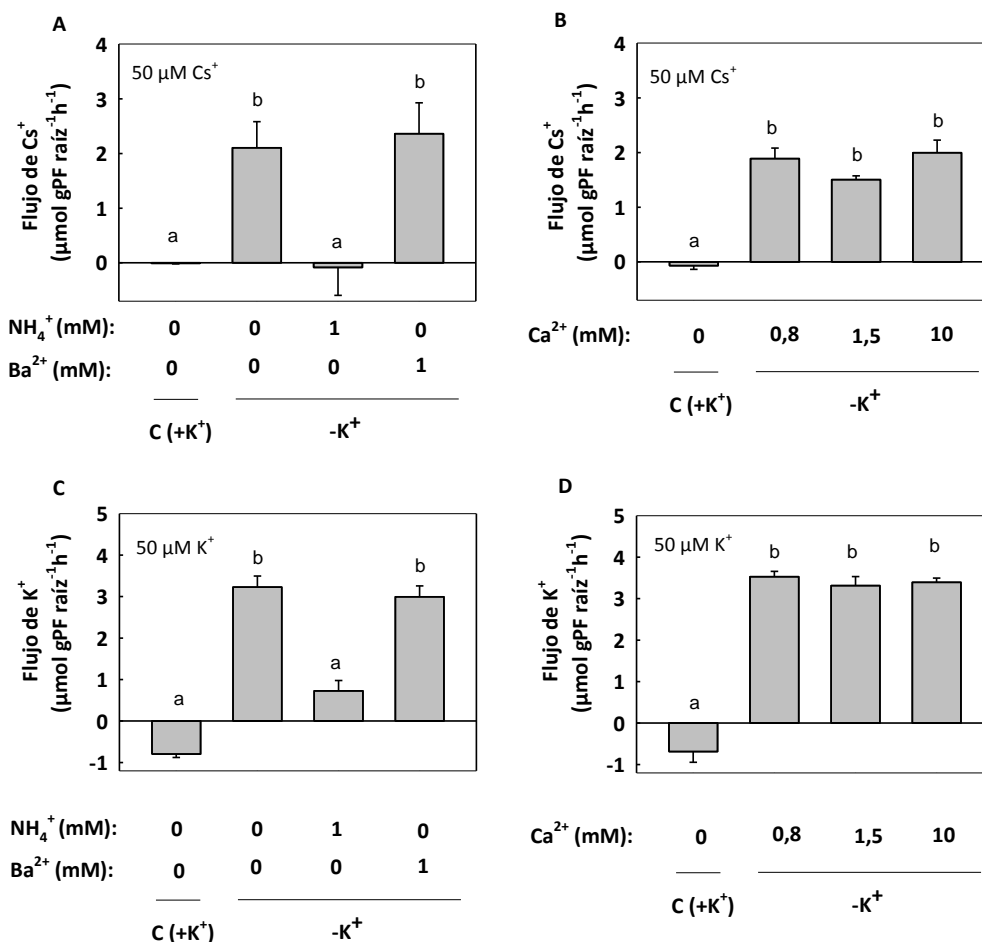


Figura 95. Tasa de flujo de absorción de Cs^+ y de K^+ por raíces de plantas de tomate. Se determinó la capacidad de absorción de Cs^+ y K^+ , por las raíces de plantas tratadas durante 7 días en ausencia o presencia de K^+ . De una solución externa con 50 μM de Cs^+ y presencia de NH_4^+ o Ba^{2+} (A) y Ca^{2+} (B); y de una solución externa con 50 μM de K^+ y presencia de NH_4^+ o Ba^{2+} (C) y Ca^{2+} (D). Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con diferentes letras indican diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

Para tener más evidencias de que el transportador *SIHAK5* media la absorción de Cs^+ de alta afinidad, se realizaron ensayos de desaparición de Cs^+ de la solución externa, tras el tratamiento de las plantas en condiciones que reprimen el gen *SIHAK5*.

Las plantas ayunadas de K^+ y tratadas con Na^+ , conocido inhibidor de la expresión de *SIHAK5* (Nieves-Cordones, M. y col., 2007), presentaron un menor flujo de absorción de Cs^+ que las ayunadas de K^+ en ausencia de Na^+ (Figura 96). Y la capacidad de absorción de Cs^+ fue menor conforme mayor era la concentración de Na^+ presente en la SN de tratamiento.

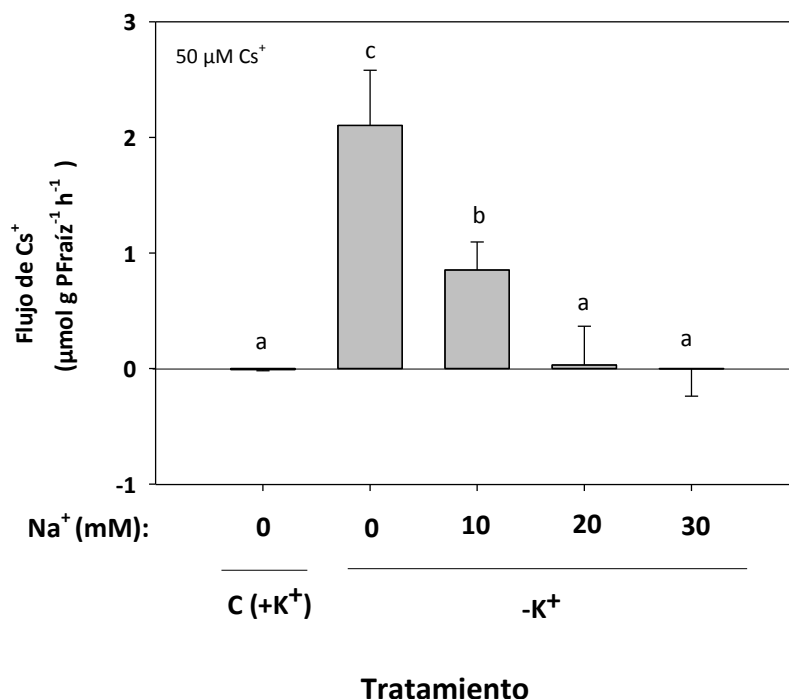


Figura 96. Tasa de absorción de Cs⁺ por raíces de plantas de tomate tratadas en presencia y ausencia de K⁺ y concentraciones crecientes de Na⁺. Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con diferentes letras indican diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

Puesto que se ha demostrado que *SIHAK5* se inhibe por tratamientos que despolarizan la membrana plasmática, y el Cs⁺ produce este efecto (Nieves-Cordones, M. y col., 2008; Nieves-Cordones, M. y col., 2017; Caballero, F. y col., 2012), se determinó el flujo de Cs⁺ desde una solución externa con 50 µM de Cs⁺ por las raíces de plantas tratadas durante 7 días en ausencia de K⁺ y presencia de distintas concentraciones de Cs⁺ (0, 12,5, 25 y 50 µM). La presencia de concentraciones micromolares de Cs⁺ durante el tratamiento de ayuno de K⁺ disminuyó la tasa de absorción de dicho catión en el rango de alta afinidad (Figura 97A).

En paralelo, las plantas tratadas en las mismas condiciones se destinaron a extraer el ARN y sintetizar el ADNc correspondiente para medir los niveles de expresión de *SIHAK5* mediante PCR en tiempo real. La inducción del gen *SIHAK5* debida al ayuno de K⁺, se inhibió en las plantas tratadas con Cs⁺ a concentraciones micromolares (Figura 97B).

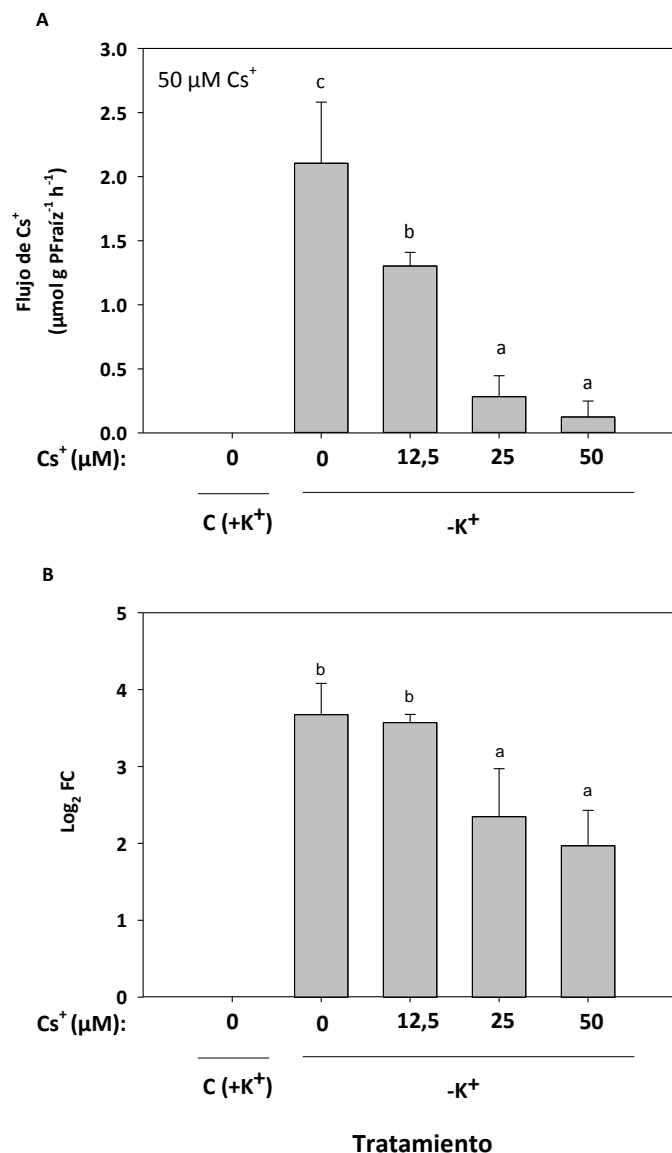


Figura 97. Tasa de absorción de Cs⁺ (A) y niveles de expresión del gen *SIHAK5* (B) de raíces de plantas de tomate tratadas en presencia y ausencia de K⁺ y concentraciones crecientes de Cs⁺. Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con diferentes letras indican diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

Debido a que la presencia de Cs⁺ micromolar reprime la sobreexpresión del gen *SIHAK5* inducido por ayuno de K⁺, se determinó el efecto de estas concentraciones de Cs⁺ sobre la absorción de K⁺ de alta afinidad. Se realizó un experimento de desaparición del K⁺ de una solución externa que contenía 50 μM de K⁺ por las raíces de plantas de tomate tratadas de igual forma, en ayuno de K⁺ y presencia de distintas concentraciones de Cs⁺. La presencia de Cs⁺ en la solución de tratamiento redujo la capacidad de absorber K⁺ de alta afinidad de estas plantas ayunadas de K⁺ (Figura 98).

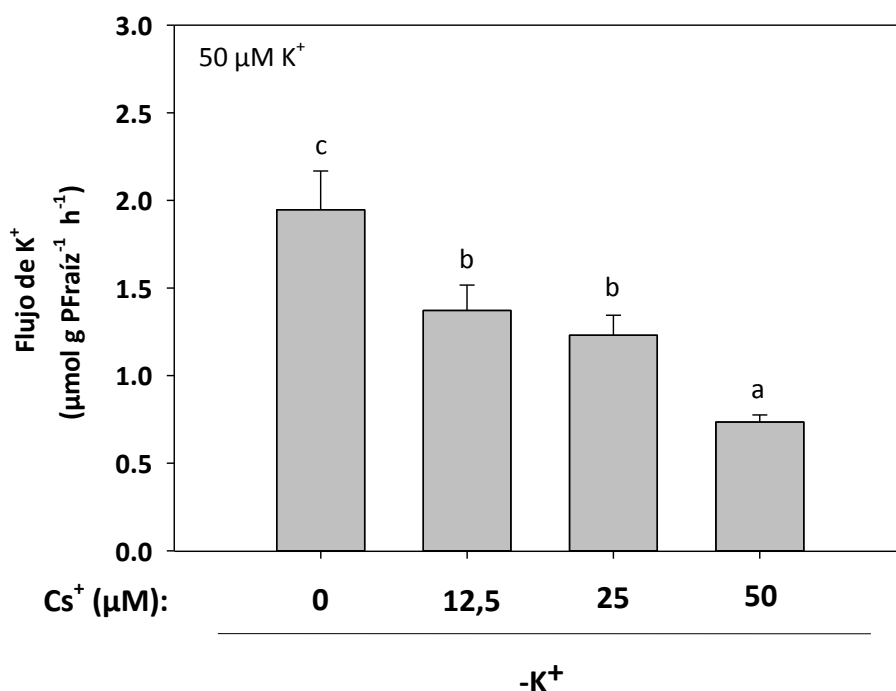


Figura 98. Efecto de la presencia de concentraciones micromolares de Cs⁺ en la absorción de K⁺ de alta afinidad por plantas ayunadas de K⁺. Tasa de absorción de K⁺ por raíces de plantas de tomate tratadas en ausencia de K⁺ y presencia de crecientes concentraciones de Cs⁺ (12,5, 25 y 50 µM), calculadas como la variación en la concentración de K⁺ en la solución externa, por gramo de peso fresco de raíz y unidad de tiempo. Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con diferentes letras indican diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

Como ya se ha mostrado en esta memoria de Tesis Doctoral (Capítulo 2, apartado 1), la presencia de Ag⁺ (bloqueante del efecto del etileno), o de DPI (inhibidor de la producción de ROS) en la SN de tratamiento, reprime la inducción del gen *SIHAK5* producida en condiciones de ayuno de K⁺ y la absorción de K⁺ de alta afinidad asociada a dicha inducción. Por ello, se utilizaron estos compuestos para profundizar en el estudio de la absorción de Cs⁺ de alta afinidad. El tratamiento con Ag⁺ y DPI dio lugar a la disminución de las tasas de absorción de Cs⁺, y esta reducción fue mayor conforme mayor era la presencia de estos compuestos en la SN (Figura 99 A y B).

La disminución de la absorción de Cs⁺ de alta afinidad en condiciones en las que el transportador *SIHAK5* está inhibido, parece indicar que la absorción de este catión en el rango micromolar estaría mediada por este transportador.

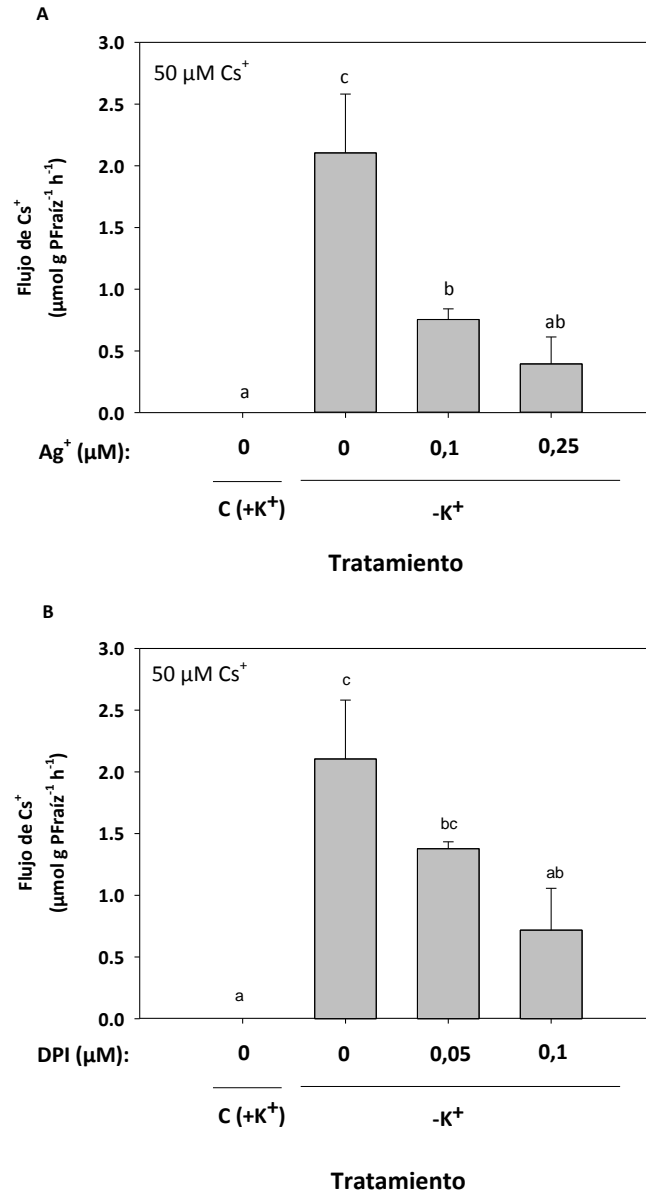


Figura 99. Tasa de absorción de Cs⁺ por raíces de plantas de tomate tratadas en presencia y ausencia de K⁺ y presencia de Ag⁺ (C) o DPI (D). Se muestra la media de 3 repeticiones y las barras con diferentes letras indican diferencia significativa a $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

DISCUSIÓN

Debido a su competición con el K^+ , la presencia de altas concentraciones de Cs^+ en el medio provoca una disminución en el contenido de K^+ en raíz y parte aérea de la planta (Cline, J.F. y Hungate, F.P., 1960; Hampton, C.R. y col., 2004; Nieves-Cordones, M. y col., 2017). En *Arabidopsis*, esta disminución del contenido de K^+ (Adams, E. y col., 2013) es similar a la que produce un ayuno del nutriente durante 7 días, que induce el sistema de entrada de K^+ de alta afinidad *AtHAK5* (Rubio, F. y col., 2008). Sin embargo, la inducción que observan (Adams, E. y col., 2013) en las plantas tratadas con altas concentraciones de Cs^+ es muy inferior a la observada en las plantas ayunadas de K^+ (Rubio, F. y col., 2008). Esto es compatible con la idea de que la presencia de Cs^+ reprime la inducción de *AtHAK5* debida a la falta de K^+ . En este estudio se han expuesto plantas de tomate a presencia de K^+ y concentraciones de 1 mM de Cs^+ . Estas plantas mostraron síntomas de toxicidad (Figura 88) y menores concentraciones de K^+ (Figura 90). Sin embargo, no se observó inducción del gen *SlHAK5*, sino represión el mismo (Figura 91), ni tampoco se observó absorción de K^+ de alta afinidad (Figura 89). Por tanto, aunque la presencia de Cs^+ da lugar a la represión de la inducción del sistema de absorción de K^+ de alta afinidad mediado por *HAK5*, podrían existir diferencias en la respuesta a la presencia de Cs^+ en tomate y *Arabidopsis*.

Las plantas de tomate tratadas en condiciones de K^+ suficiente y presencia de Cs^+ , acumularon Cs^+ en la parte aérea y en la raíz (Figura 93). Esto significa que hay un sistema de absorción de Cs^+ en la planta de tomate que funciona en estas condiciones. Este sistema es sensible al Ca^{2+} , de igual forma a como se ha mostrado en *Arabidopsis* (Broadley, M. y col., 2001; Caballero, F. y col., 2012). El aumento de las concentraciones externas de Ca^{2+} dio lugar a una menor acumulación de Cs^+ (Figura 92C) pero no redujo las concentraciones internas de K^+ de las plantas (Figura 92D). Esto podría explicarse si los mecanismos de absorción de Cs^+ y K^+ en el rango de baja afinidad son distintos. Mientras que la absorción de Cs^+ podría llevarse a cabo vía NSCC, la absorción de K^+ de baja afinidad tendría lugar a través del homólogo a *AKT1* en tomate, *LKT1* (Hartje, S. y col., 2000), aunque no se puede descartar que los NSCC también contribuyan a la absorción de K^+ de baja afinidad.

Aunque la presencia de Cs^+ a concentraciones micromolares no produzca toxicidad en la planta, su acumulación en cultivos, como en tomate (Yasutaka, T. y col., 2014), puede causar problemas de salud animal y humana si se trata de radiocesio. Se ha propuesto en *Arabidopsis* al transportador de K^+ de alta afinidad como candidato para la absorción de Cs^+ de alta afinidad

(Genies, L. y col., 2017; Hampton, C.R. y col., 2004; Qi, Z. y col., 2008). Recientemente, se han publicado estudios sobre los mecanismos moleculares implicados en la absorción de Cs^+ radiactivo en arroz (Nieves-Cordones, M. y col., 2017; Ishikawa, S. y col., 2017). Estos estudios también proponen a los sistemas de absorción de K^+ de alta afinidad como candidatos para la absorción de Cs^+ por parte de las raíces de las plantas de arroz en este rango de concentraciones de Cs^+ .

En esta Tesis Doctoral se observa que únicamente las plantas ayunadas de K^+ presentaron absorción de Cs^+ de alta afinidad. Esta absorción de Cs^+ mostró ser sensible a NH_4^+ externo, e insensible a Ba^{2+} y Ca^{2+} (Figura 95), características de absorción similares a las de la absorción de K^+ de alta afinidad. Estos resultados indican que la entrada de K^+ y Cs^+ de alta afinidad puede tener lugar por el mismo sistema, muy posiblemente el transportador *SIHAK5*.

Para profundizar en este estudio, se caracterizó la absorción de Cs^+ en condiciones que afectan a la expresión de *SIHAK5*. La presencia de Na^+ , que reprime el sistema *SIHAK5* (Bacha, H. y col., 2015; Nieves-Cordones, M. y col., 2017), redujo la absorción de Cs^+ de alta afinidad (Figura 96). También se estudió el efecto de la presencia de Cs^+ durante el proceso de ayuno de K^+ , puesto que se ha demostrado que *SIHAK5* se inhibe por tratamientos que despolarizan la membrana plasmática, y el Cs^+ produce este efecto (Nieves-Cordones, M. y col., 2017; Caballero, F. y col., 2012; Nieves-Cordones, M. y col., 2008). La presencia de concentraciones micromolares de Cs^+ en la solución nutritiva donde crecen las plantas ayunadas de K^+ da lugar a la represión de la inducción de *SIHAK5* debida a la falta de K^+ (Figura 97B), y de la absorción de Cs^+ de alta afinidad (Figura 97A). Por último, se estudió el efecto de la presencia de Ag^+ y DPI durante el tratamiento de ayuno de K^+ , compuestos que inhiben la expresión de *SIHAK5* (Figura 54) por interceptar la cascada de señalización del etileno y de las ROS, respectivamente. En condiciones de ayuno de K^+ y presencia de estos compuestos, se observó que la tasa absorción de Cs^+ de alta afinidad por las raíces de estas plantas era menor que la de plantas ayunadas de K^+ sin tratar con estos inhibidores de la expresión de *SIHAK5* (Figuras 99 A y B). Todos estos resultados muestran una relación entre la expresión de *SIHAK5* y la absorción de Cs^+ de alta afinidad, por lo que se puede concluir que muy probablemente, la absorción de K^+ y de Cs^+ de alta afinidad se lleva a cabo por el mismo sistema, el transportador *SIHAK5*.

En *Arabidopsis*, además de *AtHAK5*, se ha sugerido que los NSCC podrían contribuir a la absorción de Cs^+ en el rango micromolar (Genies, L. y col., 2017; Kanter, U. y col., 2010). En arroz no parece ocurrir lo mismo, ya que las líneas con mutaciones nulas en el gen *OsHAK1* no muestran absorción de alta afinidad de K^+ ni de Cs^+ (Nieves-Cordones, M. y col., 2017; Chen, G.

y col., 2015). Las plantas de tomate parecen ser similares a las de arroz, ya que el tratamiento con Ca^{2+} , inhibidor de los NSCC, no influyó en la absorción de Cs^+ de alta afinidad (Figura 95B), mientras que la presencia de NH_4^+ , inhibidor de transportadores HAK5, anuló totalmente dicha absorción (Figura 95A).

La absorción de Cs^+ mediada por SIHAK5 puede llevar a una acumulación importante de Cs^+ en la planta, especialmente en la raíz. Las plantas ayunadas de K^+ y expuestas a 50 μM de Cs^+ presentaron una concentración de Cs^+ similar a la presente en las raíces de plantas tratadas con K^+ y 1 mM de Cs^+ (Figuras 93 y 90, respectivamente). Sin embargo, los síntomas de toxicidad solamente se observan en las plantas tratadas con mayores concentraciones de Cs^+ (Figura 88). En *Arabidopsis* se ha descrito que la toxicidad por Cs^+ no está relacionada con la concentración de Cs^+ *per se*, sino con la relación Cs^+/K^+ de los tejidos, especialmente en la parte aérea (Hampton, C.R. y col., 2004). En los resultados de esta Tesis Doctoral descritos para las plantas de tomate, se observa que la parte aérea de las plantas tratadas con K^+ y 1 mM de Cs^+ mostraba un mayor cociente Cs^+/K^+ (0,3) que el de las plantas ayunadas de K^+ y expuestas a 50 μM de Cs^+ (0,25). Por tanto, el modelo relacionado con la toxicidad por Cs^+ en *Arabidopsis* podría extenderse a las plantas de tomate.

El estudio de los sistemas implicados en la adquisición y translocación de Cs^+ es de gran importancia, puesto que la identificación y caracterización de dichos sistemas permitiría diseñar estrategias para reducir la acumulación del Cs^+ en los cultivos. Para reducir la acumulación de Cs^+ en la planta se podrían utilizar tanto estrategias de manejo de cultivo como biotecnológicas. La fertilización con K^+ , que reduce la absorción de Cs^+ (Lembrechts, J., 1993), prevendría la inducción de los transportadores HAK5, que median la adquisición de Cs^+ de alta afinidad. La presencia de concentraciones moderadas de Na^+ podrían interferir con la inducción de *SIHAK5* y, por tanto, con la absorción de Cs^+ observada en tomate (Figura 96). A nivel biotecnológico, la obtención de transportadores que mejoren la discriminación entre el K^+ y el Cs^+ podría ser interesante. Se han llevado a cabo algunos progresos en la obtención de versiones de HAK5, con mutaciones en ciertos residuos, con mayor tolerancia al Cs^+ en levadura (Aleman, F. y col., 2014). Por tanto, se podría considerar el transportador SIHAK5 como una diana biotecnológica para reducir la acumulación de cesio radiactivo en plantas de tomate.

CAPÍTULO 4:

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE PLANTAS DE TOMATE SUJETAS A AYUNO DE K⁺.

En paralelo a los estudios fisiológicos y moleculares llevados a cabo en esta Tesis Doctoral para estudiar los sistemas de absorción y translocación de K^+ en las plantas, se consideró necesario profundizar de forma especial en la regulación de estos sistemas mediante el uso de tecnologías -ómicas y de biología de sistemas. En particular, se aborda un estudio transcriptómico en parte aérea, raíz y fruto de plantas de tomate sometidas a ayuno de K^+ usando para ello la tecnología del RNA- seq, una de las nuevas técnicas más extendidas hoy en día en los estudios transcriptómicos. Toda la información obtenida puede ser integrada e interpretada, y es de gran utilidad para estudiar procesos biológicos y mecanismos de coexpresión.

1- DISEÑO EXPERIMENTAL Y SECUENCIACIÓN

El estudio global del transcriptoma y la aplicación de abordajes de biología de sistemas permite establecer patrones de regulación génica coordinada, lo que contribuye no solo a dilucidar la función y agrupamiento de varios genes bajo un estímulo o condición específica, sino también a identificar elementos comunes de regulación a varios genes.

Se decidió realizar un ensayo de RNA-seq con el objetivo de identificar transcritos expresados diferencialmente en raíz, parte aérea y fruto de plantas de tomate sometidas a ayuno de K^+ . En MyM, apartado 2.5.2, se describe de forma detallada el proceso llevado a cabo desde el cultivo de las plantas hasta la obtención de los niveles de expresión de los transcritos.

Una vez germinadas las plantas y crecidas durante 7 días en SN 1/5 de Hoagland modificada con todos los nutrientes (solución control), la mitad de las plantas se traspasaron a una SN con las mismas condiciones (solución control) y la otra mitad, a solución 1/5 de Hoagland modificada sin K^+ . Transcurridos 3 días de ayuno de K^+ , se llevó a cabo un ensayo de desaparición de K^+ de una solución externa en el rango de alta afinidad (MyM apartado 2.1.2.2.2). A los 5 y 7 días de ayuno de K^+ también se realizaron ensayos de desaparición de K^+ de igual forma al ensayo realizado a los 3 días. Todas las raíces de las plantas sometidas a ayuno de K^+ , tanto a 3 días como a 5 y 7 días, mostraron absorción de K^+ de alta afinidad (Figura 100).

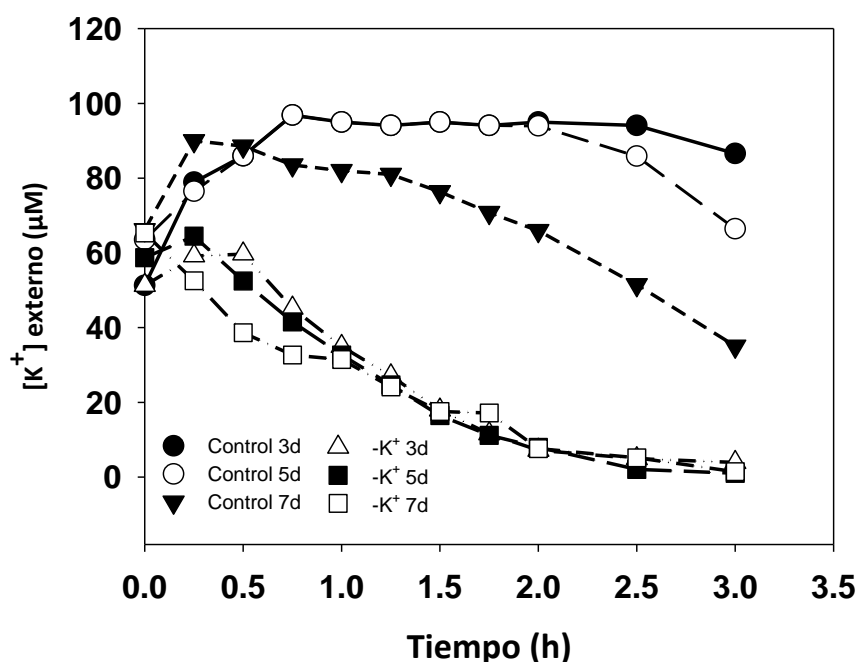


Figura 100. Gráfica de desaparición de K^+ respecto al tiempo, desde una solución externa con $50 \mu M$ de K^+ , por parte de las raíces de las plantas de tomate. Las raíces de las plantas tratadas en condiciones control durante 3 días (círculos negros), 5 (círculos blancos) y 7 días (triángulos negros) no mostraron absorción de K^+ de alta afinidad; mientras que las raíces de las plantas sometidas a ayuno de K^+ durante 3 días (triángulos blancos), 5 días (cuadrados negros) y 7 días (cuadrados blancos), absorbieron todo el K^+ contenido en la solución externa transcurridas las 3 h de experimento. Se muestra un experimento representativo.

Se decidió llevar a cabo extracción de ARN y posterior secuenciación para el análisis transcriptómico, de la parte aérea y raíz de las plantas sometidas a 5 días de ayuno de K^+ (M2). Los frutos para el análisis transcriptómico se recolectaron de las muestras que tenían 29 días de edad y estuvieron sometidas a un total de 12 días de tratamiento.

La extracción de ARN se llevó a cabo mediante el método TRIzol (ver MyM apartado 2.5.2.3). Este procedimiento de extracción de ARN fue recomendado por la Empresa BGI, encargada de la secuenciación de las muestras. Para comprobar la calidad del ARN extraído, se realizó la electroforesis en gel de las muestras (Figura 101) y la medida de concentración y pureza del ARN de las mismas (Tabla 52).

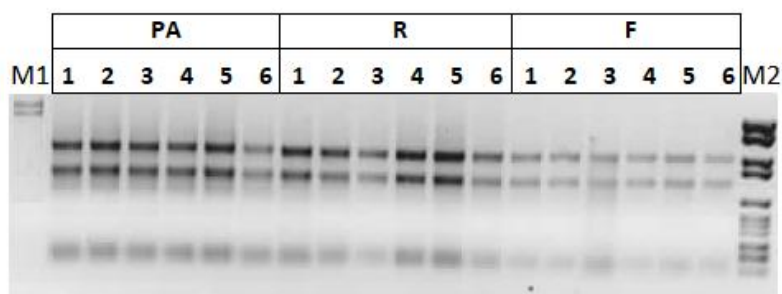


Figura 101. Electroforesis de las muestras de ARN extraídas de parte aérea (PA), Raíz (R) y Fruto (F) de plantas de tomate crecidas en condiciones control (muestras de 1-3) y sometidas a ayuno de K^+ (de 4-6). Se observan, de arriba a abajo, las bandas de las subunidades 28S, 18S y 5S de ARN ribosómico. M1= marcador de peso molecular Lambda DNA /HindIII (Roche); M2= DNA Molecular Weight Marker VI (Roche).

La concentración y pureza del ARN presente en cada muestra se determinó mediante Absorbancia de UV a 260 nm y 280 nm con el sistema Nanodrop© ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc). La absorbancia a 280 nm indica una posible contaminación con proteínas y compuestos fenólicos. La relación de absorbancia 260/280 debe ser entre 1,8 y 2,0 para considerar una extracción de buena calidad (Sambrook y Rusell, 2001). Como se puede observar (Tabla 52), todas las muestras de ARN cumplieron con los requisitos para que la Empresa BGI pudiese llevar a cabo la secuenciación. (MyM apartado 2.5.2.4).

Tabla 52. Concentraciones y pureza de las muestras de ARN. Extracción de ARN de raíz (R), parte aérea (PA), y fruto (F) de plantas sometidas a las condiciones control (muestras 1-3), y ayunadas de K⁺ durante 5 días (muestras 4-6).

Parte	Planta	C (ng μL^{-1})	260/280
R	1	524,8	2,05
R	2	476,7	1,92
R	3	364,3	1,94
R	4	627,4	1,97
R	5	770,2	1,96
R	6	368,3	2,04
PA	1	625,1	2,01
PA	2	708,8	1,98
PA	3	775,7	2,01
PA	4	808,2	1,83
PA	5	908,7	1,91
PA	6	206	1,89
F	1	272,3	1,98
F	2	331,6	1,9
F	3	347,7	2
F	4	268,2	1,85
F	5	263,2	2,02
F	6	322,6	1,9

2-ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS DE RNA-seq.

Una vez obtenidos los datos de secuenciación en crudo para cada muestra, el análisis bioinformático se llevó a cabo durante una estancia de 3 meses en la Universidad de Nottingham, bajo la supervisión del Profesor Malcolm Bennett. El procesamiento bioinformático fue realizado en el Centro ADAC (*'Advanced Data Analysis Centre'*), Universidad de Nottingham, bajo la dirección del Dr. Tom Giles.

El resultado de la secuenciación de las muestras fue de aproximadamente unas 700.000 lecturas pareadas para cada uno de los distintos tejidos (PA, R y F) resultando en, aproximadamente, 2 millones de lecturas totales. Tras la ejecución del primer paso, pre-procesamiento de las lecturas (MyM apartado 2.5.2.5.1), se eliminó el 2 % del total en el proceso de 'limpieza', por ser lecturas desapareadas o de baja calidad (Tabla S1, Material Suplementario, MS).

El conjunto total de lecturas filtradas se alineó contra el genoma de tomate de referencia utilizando la herramienta **HISAT2** (Kim, D. y col., 2015) (MyM apartado 2.5.2.5.2). Un 85,5 % del total de lecturas filtradas alineó frente al genoma de tomate (Tabla S2, MS).

Una vez alineadas las lecturas, se ensamblaron con el genoma de tomate y se realizó la estimación de la abundancia de las lecturas alineadas mediante la herramienta **Stringtie** (Pertea, M. y col., 2015), generándose un índice FPKM (del inglés *'Fragments Per Kilobase per Million reads mapped'*) (MyM apartado 2.5.2.5.3).

De los transcritos ensamblados, el programa **Stringtie** distinguió varios tipos: transcritos anotados en el genoma de tomate, a los que les asigna el identificador correspondiente de dicho genoma (ejemplo: Solyc07g005920); los que no se han anotado en el genoma, a los que asigna un ID propio del programa (MSTRG.X, donde 'X' hace referencia a un número, que va creciendo conforme van ensamblándose en el genoma); transcritos del tipo *'non-coding'* ARN, a los que el programa les asigna el ID 'NC_RNA_X_Y', donde X hace referencia al cromosoma donde se alinea el transcrito, e 'Y' al número asignado según se ensamblan en el genoma; transcritos 'tRNA', designados de forma similar 'TRNA_X_Y'; y transcritos 'rRNA', a los que les asigna un ID del tipo 'RRNA_X_Y'. En la Tabla S3 (MS) se recoge el número de transcritos de cada tipo, obtenidos para cada una de las partes de tomate.

Finalmente, con la herramienta **Ballgown** (Frazee, A.C. y col., 2014), se calcularon los niveles de expresión diferencial (medidos como FPKM) entre las distintas condiciones estudiadas (control y ayuno de K⁺), en parte aérea, raíz y fruto de las plantas de tomate. El archivo de salida generado para cada muestra consistió en un archivo de texto en formato tabla, donde aparece información para cada transcrito alineado, entre la que destaca: la identificación que otorga el programa a cada uno (transcript_ID), número de exones que contiene, longitud del transcrito, posición en el genoma, nombre del gen asociado (si está anotado) y valor de FPKM para cada repetición biológica. En base al número de FPKM para cada condición estudiada, se obtiene también el número de veces que se expresa un transcrito en la muestra ayunada de K⁺ con respecto a la muestra control, valor 'Fold Change' (FC), el logaritmo en base 2 de 'Fold Change' (log₂ FC) y el p-valor para cada condición estudiada.

2.1- VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE RNA-seq.

Se denominan genes 'housekeeping' aquellos que codifican proteínas implicadas fundamentalmente en el metabolismo celular, cuya expresión se mantiene relativamente constante en la mayoría de los tejidos y bajo distintas condiciones ambientales, por lo que se utilizan como controles de la cuantificación de la expresión génica (Thellin, O. y col., 1999). Coker, J.S.a.D., E, (2003) identificaron candidatos de genes 'housekeeping' en raíz, parte aérea, fruto y flores de tomate. Con el objetivo de comprobar la calidad del ensayo de RNA-seq realizado, se observó el valor de expresión obtenido de 3 de los candidatos propuestos por Coker, J.S.a.D., E, (2003) en raíz, parte aérea y fruto de tomate (Tabla 53).

Tabla 53. Niveles de expresión de genes 'Housekeeping' encontrados en el ensayo de RNA-seq en raíz (R), parte aérea (PA) y fruto (F) de plantas de tomate sometidas a ayuno de K⁺. Se consideró expresión diferencial significativa cuando el p- valor era menor a 0,05.

Parte	Gen 'Housekeeping'	Transcrito ID	Log ₂ FC	p-valor
R	<i>60S acidic ribosomal protein</i>	Solyc01g104370.2.1	0.090043524	0.277693398
	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	Solyc03g093300.2.1	0.295047752	0.191703221
	<i>UDP-glucose: protein transglucosylase</i>	Solyc01g005120.2.1	-0.811880395	0.463514721
PA	<i>GAPDH</i>	Solyc04g009030.2.1	0	NA
	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	Solyc07g066610.1.1	0.654785618	0.109412217
	<i>Catalase</i>	Solyc02g082760.2	0.181862107	0.670932873
F	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	Solyc06g034180.2.1	0	NA
	<i>DnaJ-like protein</i>	Solyc02g080130.2.1	0.424103071	0.101507022
	<i>DnaJ-like protein</i>	Solyc04g015090.1.1	0	NA

Ninguno mostró una expresión diferencial significativa (p -valor $< 0,05$), por lo que los valores de expresión obtenidos para los transcritos de este ensayo de RNA-seq se consideraron válidos para continuar con el análisis de los transcritos.

3-ANÁLISIS DE TRANSCRITOS EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE.

Una vez obtenidos los valores de expresión diferencial de los transcritos como consecuencia del ayuno de K^+ , se seleccionaron aquellos cuya expresión diferencial era significativa, utilizando como criterio de selección un p-valor menor de 0,05.

Se consideró como valor de expresión el $\log_2 FC$ ($|\log_2 FC|$), y según este valor de nivel de expresión, los transcritos se clasificaron en cuatro categorías: ‘transcritos ligeramente inducidos’ aquellos cuyo valor se encontraba entre el 0 y el 1; ‘transcritos inducidos’ con un valor superior a 1; ‘transcritos ligeramente reprimidos’ con un valor de $\log_2 FC$ entre 0 y -1; y ‘transcritos reprimidos’ aquellos con un valor inferior a -1.

De los 3.345 transcritos expresados diferencialmente en raíz, 1.260 (37,66 %) presentaron una ligera inducción ($|\log_2 FC| = 0-1$); 664 transcritos (19,85 %) se encontraban inducidos ($|\log_2 FC| \geq 1$); 1.042 (31,15 %) presentaron una ligera represión ($|\log_2 FC| = 0-(-1)$); y 379 transcritos (11,33 %) se encontraban reprimidos ($|\log_2 FC| \leq -1$) (Figura 102 y Tabla 54).

En cuanto a la parte aérea, 387 transcritos (9,01 %) se encontraban ligeramente inducidos mientras que 1.418 transcritos (33,01 %) se encontraban inducidos. En mayor proporción se encontraron los transcritos ligeramente reprimidos (23,70 %) y los reprimidos (34,27 %), abarcando el 58 % del total de transcritos diferencialmente expresados en la parte aérea (Figura 102 y Tabla 54).

La cantidad total de transcritos diferencialmente expresados en el fruto fue menor que en el resto de las partes (Tabla 54), predominando claramente los transcritos expresados ligeramente reprimidos (49,21 %) y ligeramente inducidos (36,71 %) frente a los inducidos (6,08 %) y reprimidos (7,99 %) (Figura 102 y Tabla 54).

Tabla 54. Número de transcritos expresados diferencialmente en raíz, parte aérea y fruto de plantas de tomate sometidas a ayuno de K⁺. En base al valor de log₂ FC obtenido, se clasificaron en distintas categorías.

	Raíz	Parte aérea	Fruto
'Ligeramente inducidos' log ₂ FC = 0-1	1.260	387	767
'Inducidos' log ₂ FC ≥ 1	664	1.418	127
Total inducidos log ₂ FC > 0	1.924	1.805	894
'Ligeramente reprimidos' log ₂ FC = 0-(-1)	1.042	1.018	1.028
'Reprimidos' log ₂ FC ≤ (-1)	379	1.472	167
Total reprimidos log ₂ FC < 0	1.421	2.49	1.195
Total transcritos expresados diferencialmente	3.345	4.295	2.089

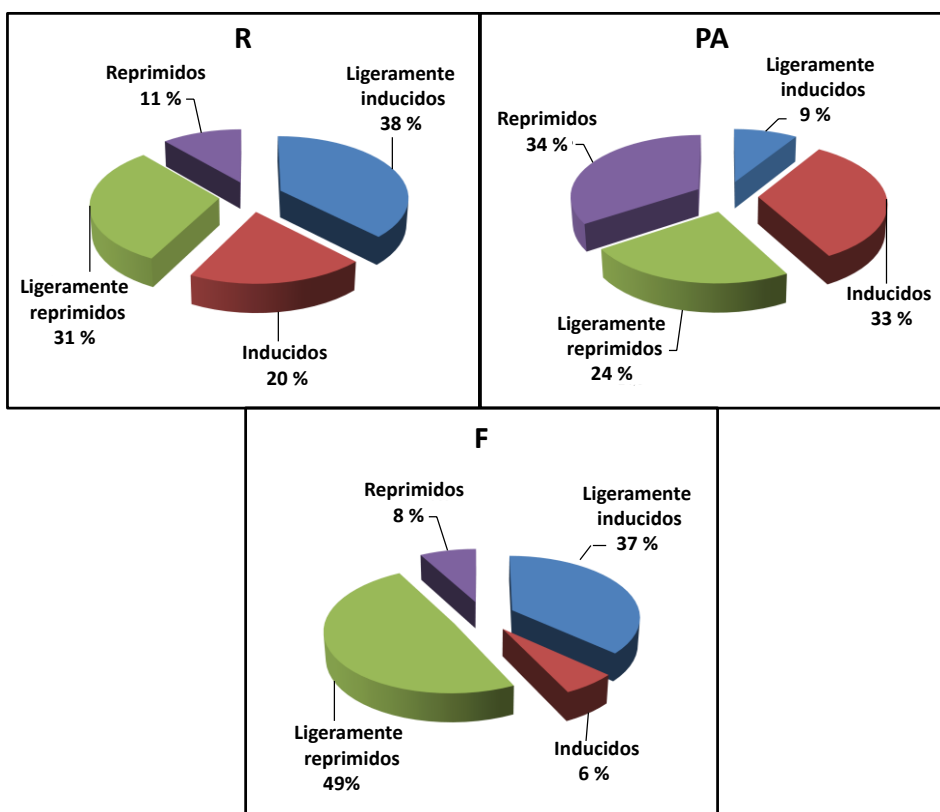


Figura 102. Diagrama circular que representa el porcentaje de transcritos expresados diferencialmente en cada categoría de transcritos, respecto al total de transcritos expresados diferencialmente, en muestras de raíz (R), parte aérea (PA) y fruto (F), de plantas de tomate sometidas a condiciones de ayuno de K⁺. Se muestra el porcentaje de 'transcritos ligeramente inducidos' (en color azul); 'transcritos inducidos' (en rojo); 'transcritos ligeramente reprimidos' (en verde); y 'transcritos reprimidos' (en lila).

3.1- ANOTACIÓN FUNCIONAL.

A través del servidor PLAZA (MyM apartado 2.5.2.5), se asignaron los 'términos GO' (Ashburner, M. y col., 2000) a todos los transcritos expresados diferencialmente en condiciones de ayuno de K⁺ anotados en el genoma de tomate. De los 1.646 transcritos identificados en la raíz, se asignó anotación a 1.422; de los 2.055 transcritos de la parte aérea, se asignó anotación a 1.666; y de los 986 presentes en el fruto, se asignó anotación a 841 transcritos.

Los términos GO describen la relación entre los productos génicos en base a tres ontologías: Procesos Biológicos (BP); Componentes Celulares (CC), y Función Molecular (MF). Estos términos están jerarquizados, de forma que la jerarquía establece una serie de niveles que van aumentando conforme lo hace la caracterización del término y su descripción específica. El enriquecimiento de términos permite determinar si en un conjunto de genes dado, hay términos de GO que aparecen con significancia estadística con respecto al conjunto de genes que representan el total para ese término GO.

Se seleccionaron los términos GO significativamente enriquecidos para el primer nivel de los términos GO, y se representó el porcentaje de transcritos con respecto al total expresados diferencialmente para cada uno de ellos, en cada una de las partes de la planta de tomate (Figura 103). Como se puede observar, dentro de la categoría Procesos Biológicos (BP), predominan las subcategorías '*celular process*' (GO:0009987), '*single-organism process*' (GO:0044699) y '*metabolic process*' (GO:0008152), abarcando alrededor del 50 % de los transcritos anotados, en las tres partes de la planta. En la categoría de Componentes Celulares (CC) los tres grupos principales fueron '*cell*' (GO:0005623), '*organelle*' (GO:0043226) y '*cytoplasm*' (GO:0005737), con una proporción similar de transcritos en las tres partes de la planta. En Función Molecular (MF), destacan '*catalytic activity*' (GO:0003824) y '*binding*' (GO:0005488) para las tres partes de la planta, y con una proporción también de aproximadamente el 50 % de los transcritos anotados.

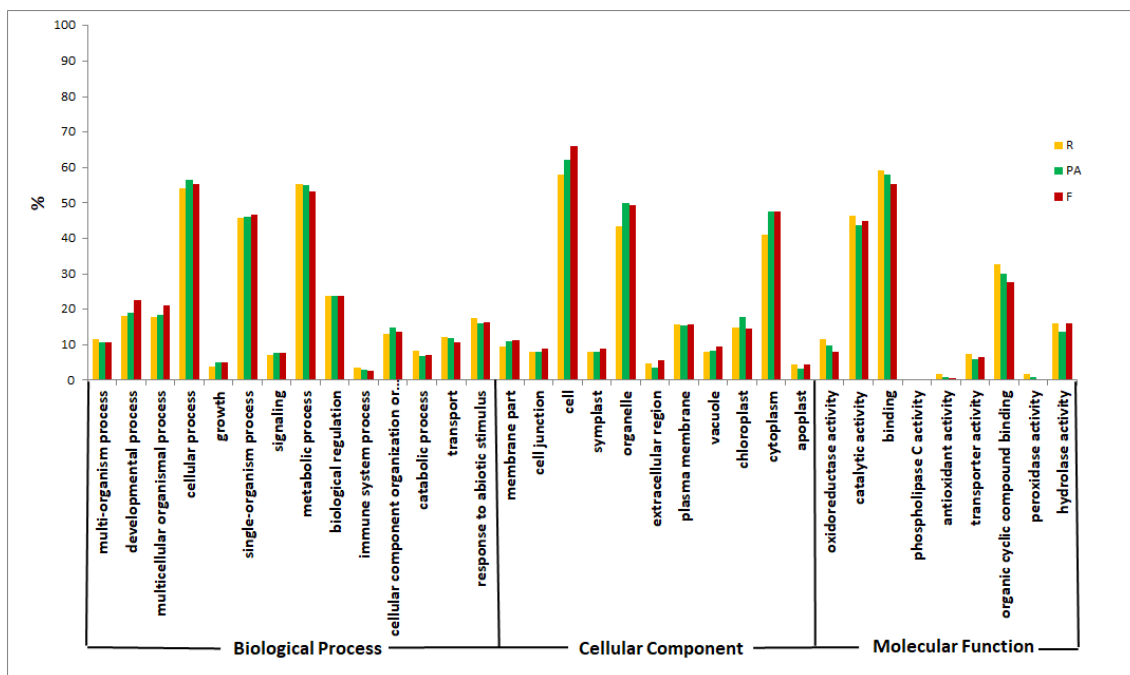


Figura 103. Porcentaje de transcritos dentro de cada categoría GO de primer nivel de los transcritos expresados diferencialmente en raíz (R, amarillo), parte aérea (PA, verde) y fruto (F, rojo) de plantas de tomate sometidas a ayuno de K^+ . Se muestra el porcentaje de transcritos presentes en cada término GO respecto al total de transcritos expresados diferencialmente que presentaron alguna anotación de GO. Para cada una de las tres ontologías (BP, CC y MF), se presentan los términos GO que mostraron enriquecimiento y el mayor número de transcritos expresados diferencialmente.

Como consecuencia del análisis con la herramienta PLAZA, se podían identificar transcritos de interés para el estudio en esta Tesis Doctoral, pero que no estaban anotados en la base Sol Genomics (<https://solgenomics.net/locus/24318/view>). En estos casos, o se obtenía información de estudios previamente publicados o se llevaba a cabo el alineamiento de la secuencia nucleotídica del transcrito mediante la herramienta BLAST (disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para la anotación del transcrito.

3.2- SELECCIÓN DE TRANSCRITOS DE INTERÉS.

3.2.1- Distribución de transcritos expresados diferencialmente por ayuno de K⁺ presentes en las tres partes de la planta.

Se realizó un diagrama de Venn (Figura 104) para mostrar el número de transcritos expresados diferencialmente presentes en cada uno de los órganos de forma individual; y el número transcritos expresados diferencialmente presentes en más de uno. Un total de 31 transcritos se encontraban expresados diferencialmente en las tres partes de la planta (Figura 104A). La raíz (R) y la parte aérea (PA), son las partes con mayor número de transcritos compartidos (385 transcritos) mientras que la raíz y el fruto (F) son las que menos comparten (161 transcritos) (Figura 104A).

El diagrama de Venn también se realizó individualmente para el total de transcritos inducidos ($|\log_2FC| > 0$) y reprimidos ($|\log_2FC| < 0$). De los transcritos inducidos, 4 de ellos se encontraban en las tres partes de la planta; 213 en R y PA; 32 transcritos en PA y F; y 37 en R y F (Figura 104B). En cuanto a los transcritos reprimidos, 3 de ellos se encontraron en las tres partes de la planta; 87 transcritos reprimidos en R y PA; 60 presentes en PA y F; y 48 transcritos en R y F (Figura 104C).

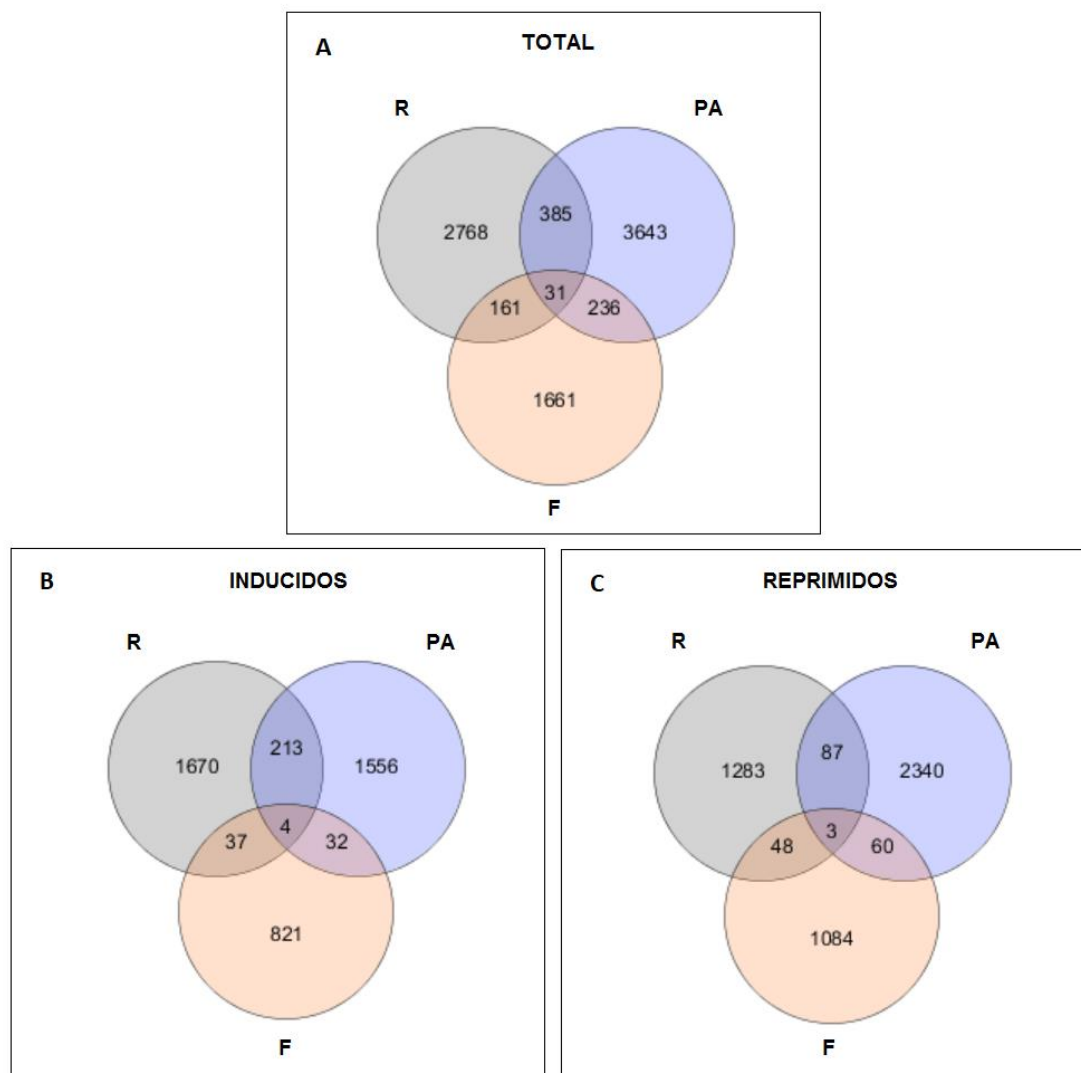


Figura 104. Diagramas de Venn correspondiente a los transcritos expresados diferencialmente tras 5 días de ayuno de K^+ en raíz (R), parte aérea (PA) y fruto (F) de plantas de tomate. Se muestra el total de transcritos (A), transcritos inducidos (B) y reprimidos (C), presentes en cada parte de la planta de forma individual, y los compartidos entre las distintas partes.

De los 31 transcritos expresados diferencialmente en las tres partes de la planta en condiciones de ayuno de K^+ (Figura 104A), 16 transcritos se encontraban anotados en el genoma de tomate, y aparecen indicados con su identificador correspondiente; 13 de ellos no se encontraban anotados, por lo que se muestran con el ID otorgado por el programa **Stringtie**; y los otros 2 transcritos fueron caracterizados por el programa como '*long non-coding ARN*', asignándole un ID específico a cada uno.

En la Figura 105 se representan los valores de expresión de estos 16 transcritos identificados, de forma que visualmente se observa cómo se encuentra expresado un mismo transcrito en las distintas partes, en respuesta a la condición de estrés (ayuno de K^+).

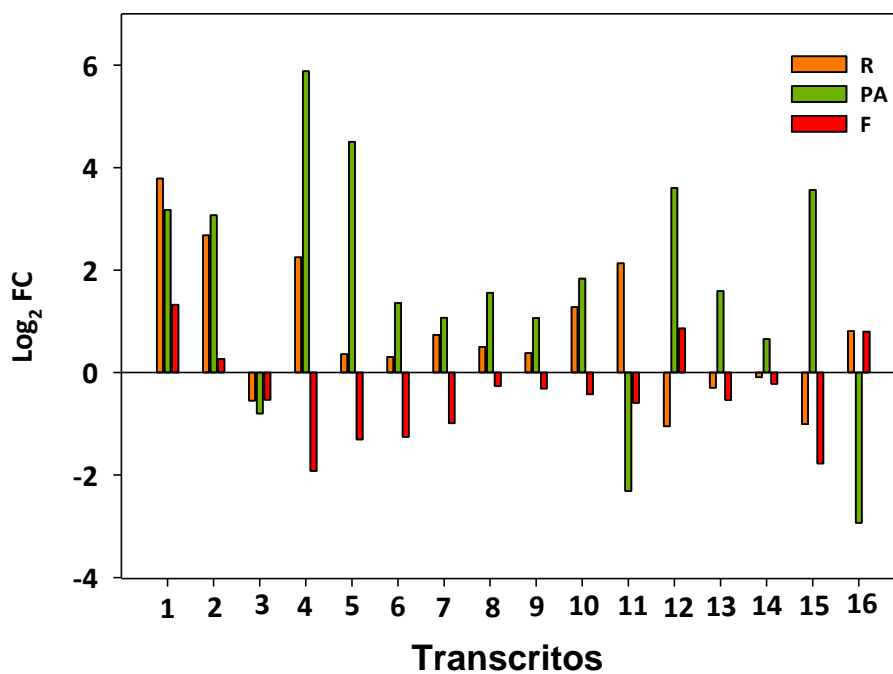


Figura 105. Transcritos expresados diferencialmente tras el ayuno de K^+ en las tres partes de la planta: raíz (R, naranja), parte aérea (PA, verde) y fruto (F, rojo) de plantas de tomate. En el eje de ordenadas se muestra el valor de expresión (\log_2FC) obtenido para cada transcrito; y en eje de abscisas, los transcritos (posiciones del 1 al 16): 1= Solyc01g107400.2.1; 2= Solyc08g078510.2.1; 3=Solyc07g052350.2.1; 4= Solyc07g006560.2.1; 5= Solyc07g061800.2.1; 6= Solyc02g089150.2.1; 7= Solyc08g083110.2.1; 8= Solyc05g013820.2.1; 9= Solyc01g096570.2.1; 10= Solyc10g050060.1.1; 11= Solyc03g078370.1.1; 12= Solyc02g068130.2.1; 13= Solyc07g056140.2.1; 14= Solyc10g018600.1.1; 15= Solyc01g073640.2.1; 16= Solyc02g070320.2.1.

De los 4 transcritos inducidos en las tres partes de la planta (Figura 104B), la mitad se encontraban anotados en el genoma de tomate, y son los correspondientes a las posiciones número 1 y 2 de la Figura 105. De los 3 transcritos reprimidos en las tres partes de la planta (Figura 104C), únicamente 1 transcrito estaba anotado, el correspondiente a la posición número 3 de la Figura 105.

Al introducir el identificador de los 16 transcritos (Figura 105) en el servidor PLAZA se obtuvo numerosa información, de entre la cual, se muestra la descripción disponible para cada uno (Tabla S4, MS).

3.2.2- Identificación de transcritos relacionados con procesos de señalización de la respuesta a la deficiencia de K⁺.

Como ya se ha comentado en esta Tesis Doctoral, se han descrito numerosos mecanismos de señalización implicados en la respuesta a la deficiencia de K⁺, un incremento de los niveles de Ca²⁺ (Behera, S. y col., 2017), cambios en los niveles de distintas fitohormonas y el incremento en los niveles de ROS (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Shin, R. y col., 2007; Armengaud, P. y col., 2004; Jung, J.Y. y col., 2009; Kim, M.J. y col., 2010). A continuación, se describen transcritos identificados que están relacionados con estos mecanismos de señalización.

3.2.2.1- Transcritos relacionados con la señalización por Ca²⁺.

Las variaciones de la concentración de Ca²⁺ en el citoplasma celular modulan multitud de procesos metabólicos relacionados con la respuesta a estímulos. En este ensayo de RNA-seq se han identificado transcritos relacionados con la señalización por Ca²⁺, cuya expresión se ha visto afectada de forma significativa en respuesta a ayuno de K⁺. Se destaca la presencia de transcritos que codifican sensores de Ca²⁺. En raíz, se ha identificado los transcritos que codifican 1 CBL, 2 CIPKs, 6 CDPKs, 3 CaMs y 8 proteínas de unión a CaMs; así como otros transcritos que codifican proteínas relacionadas con el Ca²⁺. En la Tabla S5 (MS) se recoge información referente a dichos transcritos. En la parte aérea, entre los transcritos expresados diferencialmente relacionados con la señalización por Ca²⁺, se encontró un 1 transcrito que codifica una CIPK, 1 transcrito que codifica una CDPK, 5 que codifican CaMs y 2 transcritos que codifican proteínas de unión a CaM y otras proteínas de unión a Ca²⁺ (Tabla S6, MS). En el fruto se han identificado transcritos que codifican 1 CBL, 3 CDPKs, 1 CaM, 4 proteínas de unión a CaM y otras proteínas relacionadas con la señalización por Ca²⁺ (Tabla S7, MS).

3.2.2.2- Transcritos que codifican proteínas relacionadas con ROS.

Los radicales libres juegan un papel importante en la transducción de señales, mediando, entre otras, respuestas a estrés abiótico en diferentes tipos celulares (Beers, E.P. y Mcdowell, J.M., 2001; Apel, K. y Hirt, H., 2004).

La generación de ROS por las plantas se lleva a cabo mediante la activación de varias oxidasas y peroxidasas (Allan, A.C. y Fluhr, R., 1997; Schopfer, P. y col., 2001; Bolwell, G.P. y col., 2002). En raíces de *Arabidopsis* ayunadas de K^+ se observa una inducción de los transcritos *RHD2* y *RCI3*, que codifican a una NADPH oxidasa (Shin, R. y col., 2005) y a una peroxidasa (Kim, M.J. y col., 2010), respectivamente, que estarían implicadas en la producción de ROS necesaria para la inducción de *AtHAK5* en respuesta a bajas concentraciones externas de K^+ .

En este ensayo de RNA-seq se han identificado transcritos que codifican oxidasas, peroxidasas y otras enzimas que participan en la generación de ROS, tanto en raíz (Tabla S8, MS) parte aérea (Tabla S9, MS) como en fruto (Tabla S10, MS) de plantas de tomate, cuya expresión se ha visto afectada de forma significativa tras ayuno de K^+ . En concreto, en cuanto a los transcritos que codifican peroxidasas, se encontraron 7 inducidos y 9 reprimidos en raíz; 3 inducidos y 3 reprimidos en parte aérea, y ninguno en el fruto. En cuanto a la expresión de transcritos que codifican enzimas de tipo Glutación S-transferasa, se encontraron 7 inducidos y 1 reprimido en raíz; 10 inducidos y 1 reprimido en parte aérea; y 1 inducido y 2 reprimidos en el fruto. En cuanto a la enzima de tipo Glutación peroxidasa, se encontró 1 transcrito reprimido en raíz, 3 inducidos en parte aérea, y 1 reprimido en el fruto. Únicamente se encontraron 2 transcritos que codifican NADPH oxidasas de tipo RBOH cuya expresión se vió modificada en las plantas de tomate: 1 transcrito reprimido en parte aérea, y 1 transcrito reprimido en el fruto.

3.2.2.3- Transcritos que codifican proteínas relacionadas con fitohormonas.

En las Tablas S11, S12 y S13 se recoge información sobre transcritos que codifican proteínas implicadas en la síntesis, transporte y señalización de fitohormonas, que mostraron inducción o represión de su expresión de forma significativa tras ayuno de K^+ , en raíz, parte aérea y fruto, respectivamente.

Los transcritos que codifican las enzimas implicadas en la síntesis del etileno, ACS y ACO, presentaron cambios significativos en su expresión en las raíces de plantas de tomate ayunadas de K^+ . En concreto, 2 transcritos que codifican enzimas ACS y 10 que codifican ACO (Tabla S11, MS). En la parte aérea y el fruto no se encontraron transcritos que codifiquen enzimas ACS, pero sí transcritos de enzimas ACO: 11 transcritos en la parte aérea, y 1 en fruto. También se han identificado transcritos que codifican receptores de etileno: (ETRs); un transcrito en raíz, 2 en parte aérea y 2 en el fruto.

En cuanto a la auxina, en las raíces de las plantas de tomate sometidas a ayuno de K^+ estudiadas, se han identificado transcritos que codifican un transportador de entrada de auxina (LAX), dos facilitadores de salida (PIN) y 4 proteínas de respuesta a auxina (Tabla S11, MS). En la parte aérea, se identificaron transcritos que codifican proteínas implicadas en la síntesis, transporte y respuesta a esta fitohormona. En concreto, 3 transcritos que codifican la enzima que cataliza la síntesis del ácido 3-indol acético (IAA), denominada GH3; un transportador PIN; 7 transcritos que codifican proteínas de respuesta a auxina (SAUR) y otras proteínas reguladas por auxina (Tabla S12, MS). En el fruto no se observó ningún transcrito que codificara transportadores de auxina, aunque sí mostraron cambios en su expresión transcritos que codifican enzimas implicadas en su síntesis y otras proteínas de respuesta a auxina (Tabla S13, MS).

En las tres partes de las plantas de tomate sometidas a ayuno de K^+ , se observaron cambios en la expresión de transcritos implicados en la señalización por ABA, como receptores PYL y proteínas de respuesta a ABA (Tablas S11, S12 y S13, MS).

De igual forma, se observaron cambios en la expresión de transcritos implicados en la síntesis y metabolismo, así como de receptores y proteínas reguladas por GAs, en las tres partes de la planta (Tablas S11, S12 y S13, MS).

3.2.2.4- Identificación de transcritos que codifican factores de transcripción.

En las tres partes de la planta de tomate se han identificado transcritos que codifican FT pertenecientes a distintas familias, cuya expresión se vio modificada de forma significativa tras someter a las plantas a ayuno de K^+ . En la raíz, se identificaron 112 transcritos, de los cuales 76 mostraron sobreexpresión y 36 se encontraban reprimidos. En la parte aérea se identificaron mayor número de transcritos (120), pero predominaron los transcritos reprimidos (69) frente a los inducidos (51). En el fruto, se identificó un menor número total de transcritos (53), de los cuales, 25 se encontraban inducidos y 28 reprimidos.

Existen grandes familias de genes que codifican FT que, a su vez, pueden estar compuestas por subfamilias. En plantas, se han identificado 68 familias de FT. En la Figura 106, se muestra el número de transcritos inducidos y reprimidos dentro de cada familia de FT, para cada una de las partes de la planta. En las Tablas S16; S17 y S18 de MS, se recoge información de cada transcrito.

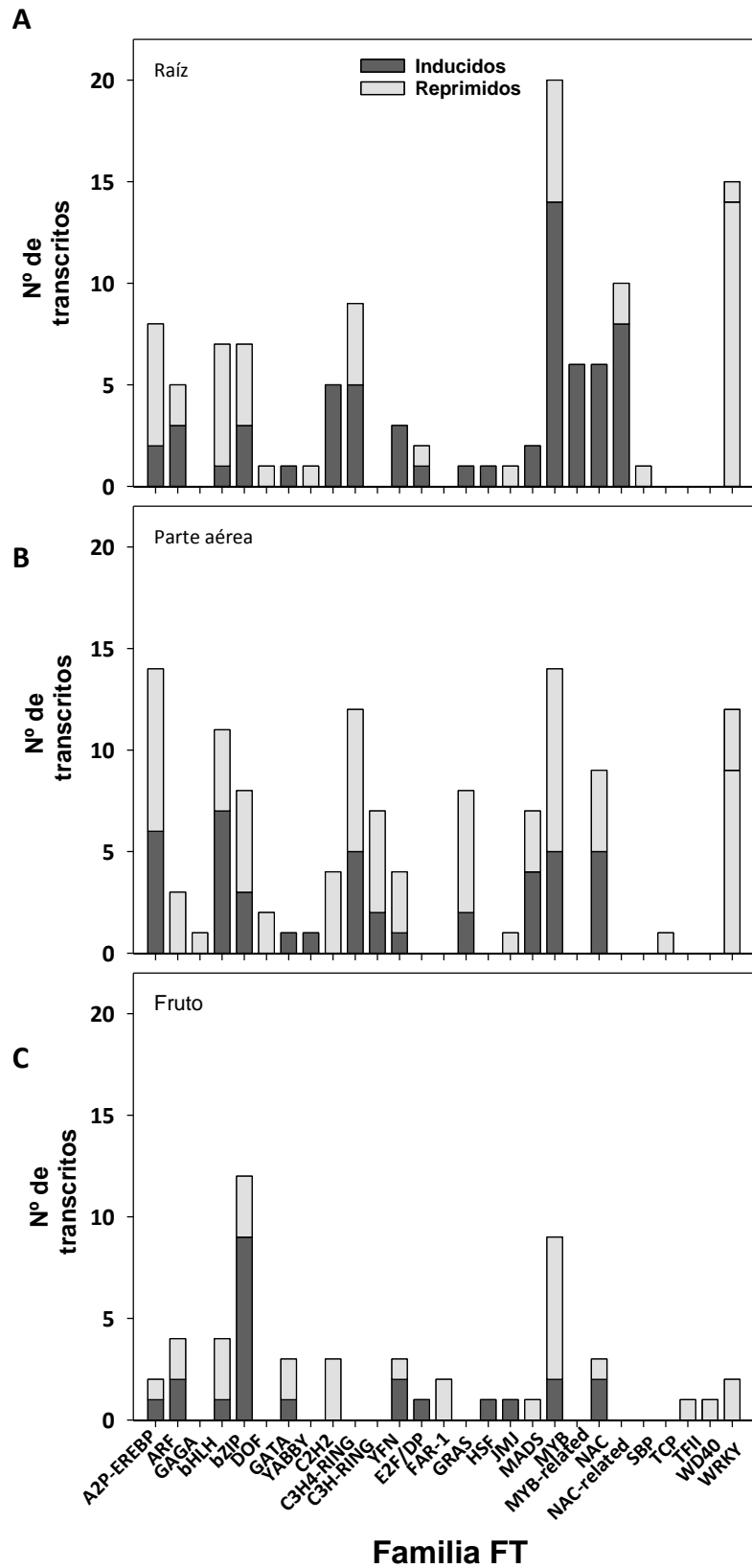


Figura 106. Número de transcritos presentes en distintas familias de factores de transcripción (FT), expresados de forma significativa en la raíz (A), parte aérea (B) y fruto (C) de plantas de tomate sometidas a ayuno de K^+ . En color gris oscuro se muestra el número de transcritos inducidos y en gris claro, transcritos reprimidos, dentro de cada familia de FT para cada una de las partes.

3.2.2.5- Transcritos que codifican proteínas relacionadas con la señalización de estreses.

Las cascadas de señalización de las proteínas MAPK (*'Mitogen-Activated Protein Kinases'*), tienen una función importante en procesos de desarrollo y en respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos (Lewis, B. y Spalding, E., 1998). En las raíces de tomate ayunadas de K^+ , se han visto inducidos 4 transcritos que codifican proteínas quinasas de tipo MAPKs (Tabla S17, MS). En la parte aérea, se encontraron 2 transcritos inducidos y 1 transcrito reprimido (Tabla S18, MS); mientras que, en el fruto, los 3 transcritos estaban reprimidos (Tabla S19, MS).

Las proteínas HSPs (*'Heat Shock Proteins'*) son proteínas de respuesta a estrés que funcionan como chaperonas, protegiendo a las plantas frente al daño ocasionado por estrés al impedir la formación de agregados de proteínas (Tripp, J. y col., 2009). Se han identificado 5 grandes familias de HSPs: HSP100 (HSPs 101), HSP90, HSP70, HSP60 y sHSPs (*'small HSPs'*) (Gupta, S.C. y col., 2010; Kotak, S. y col., 2007; Wang, W. y col., 2004). En el ensayo de RNA-seq llevado a cabo se observó la inducción de 2 transcritos y la represión de 1 transcrito que codifican proteínas HSP20s en raíces de tomate (Tabla S17, MS). En cuanto a transcritos que codifican HSP20s en la parte aérea, 2 se encontraban fuertemente inducidos y 2 reprimidos mientras que 1 transcrito que codifica a una HSP70 se encontró inducido y los transcritos que codifican a una HSPs de tipo HSP90 y una de tipo HSP101, se encontraron reprimidos (Tabla S19, MS). En el fruto, se encontraron inducidos: 1 transcrito que codifica a una HSP20 y 2 transcritos que codifican HSP70s; mientras que transcritos que codifican una HSP101 y una HSP40, estaban reprimidos (Tabla S19, MS).

3.2.2.6- Transcritos que codifican transportadores/canales de iones.

En la Tabla S20 de MS, se recoge información sobre transcritos que codifican proteínas implicadas en el transporte de distintos iones y que mostraron cambios significativos en su expresión, en respuesta a la deficiencia de K^+ en raíces de plantas de tomate.

Entre los transcritos que codifican proteínas implicadas en el transporte de K^+ en la raíz, se observó que el transcrito que codifica el transportador de K^+ de alta afinidad en plantas de tomate, SIHAK5, se encontraba inducido de forma significativa. Los transcritos que codifican el canal de K^+ SISKOR y al canal de K^+ homólogo a AKT2 de Arabidopsis, se encontraban

Resultados y Discusión: Capítulo 4

reprimidos al igual que otros dos transcritos que codifican canales de K^+ . Entre los transcritos que codifican proteínas implicadas en el transporte de otros nutrientes, se observó que los dos únicos transcritos con cambios en su expresión, que codifican transportadores de NO_3^- , se encontraban reprimidos. De los 3 transcritos identificados que codifican transportadores de SO_4^{2-} , se encontró un transcrito inducido y 2 transcritos reprimidos. Las raíces de las plantas de tomate sometidas a ayuno de K^+ también presentaron cambios en la expresión de transcritos que codifican proteínas implicadas en el transporte de Ca^{2+} . En concreto, se observó que estaban inducidos los transcritos que codifican una ATPasa de tipo ACA, un canal de tipo anexina, un canal de tipo CAX, y un canal mecano-sensible de tipo MSL; mientras que se encontró reprimido un transcrito que codifica una ATPasa de tipo ACA. Entre los transcritos que codifican otros canales de transporte de iones, 2 transcritos que codifican canales de Cl^- regulados por voltaje se encontraron reprimidos. Todos los transcritos identificados que codifican NSCC de tipo CNGC y que mostraron cambios en su expresión de forma significativa, se encontraron inducidos en las raíces de las plantas de tomate ayunadas de K^+ .

En cuanto a la presencia de transcritos expresados de forma significativa en la parte aérea de las plantas de tomate ayunadas de K^+ (Tabla S21, MS), únicamente 2 se correspondieron con transcritos que codifican proteínas implicadas en el transporte de K^+ , 1 transcrito que codifica un transportador de NO_3^- y 1 transcrito que codifica un transportador de SO_4^{2-} . A diferencia de la raíz, en la parte aérea se encontraron 3 transcritos expresados de forma significativa que codifican proteínas que transportan PO_4^{3-} ; 4 transcritos que codifican proteínas de transporte de zinc (Zn^{2+}); 2 transcritos de proteínas que transportan cobre (Cu^{+2+}) y 2 transcritos que codifican transportadores de magnesio (Mg^{2+}). También se identificaron transcritos que codifican NSCC de tipo CNGC, de los cuales, 1 transcrito se encontró inducido y 3 transcritos estaban reprimidos.

A diferencia de raíz y parte aérea, ningún transcrito que codifica transportadores o canales de K^+ mostró una expresión inducida o reprimida en respuesta al ayuno de K^+ en el fruto. Sin embargo, sí mostraron cambios significativos en su expresión en el fruto, en respuesta al ayuno de K^+ , transcritos que codifican transportadores de NO_3^- , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y Cl^- , así como canales de iones de tipo NSCC. En concreto, todos los transcritos se encontraron reprimidos, a excepción de 3 transcritos que codifican transportadores de Ca^{2+} , 2 transcritos que codifican transportadores de Zn^{2+} , y el transcrito que codifica un canal NSCC (Tabla S22, MS).

DISCUSIÓN

El análisis transcriptómico de plantas sometidas a deficiencias nutricionales permite estudiar los perfiles de expresión de los genes, pudiendo así identificar elementos que podrán ser dianas de estudios posteriores con el objetivo de poder dilucidar el papel que pudieran desempeñar en la respuesta a dichas deficiencias.

Las proteínas CIPKs y CBLs han mostrado ser importantes en la regulación de los transportadores y canales de K^+ , como el canal AKT1 (Xu, J. y col., 2006; Li, L. y col., 2006), así como en la regulación de transportadores de otros nutrientes, como el transportador de NO_3^- , AtNRT1.1 (CHL1) (Ho, C.H. y col., 2009). En Arabidopsis, la expresión de *AtCIPK23* se induce en respuesta a bajas concentraciones de K^+ externo (Cheong, Y.H. y col., 2007; Xu, J. y col., 2006). En cuanto a los transcritos expresados diferencialmente en raíz, el alineamiento de la secuencia del transcrito con ID Solyc03g083320.2.1, que mostró una represión significativa por ayuno de K^+ en raíz, reveló que dicho transcrito codifica la proteína SICBL4, también denominada SISOS3. El transcrito con ID Solyc05g053210.2.1, reprimido, codifica la proteína SICIPK1, y el transcrito con ID Solyc02g021440.2.1, inducido en raíz, codifica la proteína SICIPK23. Este resultado indicaría, que de igual forma que en Arabidopsis, en las raíces de tomate, la proteína SICIPK23 podría estar regulando en tomate, sistemas implicados en la respuesta a una deficiencia de K^+ . Esto también estaría de acuerdo con la activación por el complejo de Arabidopsis *AtCIPK23/AtCBL1* del transportador SIHAK5 observada en levadura (Figura 61). Ninguno de los transcritos identificados en la raíz mostró cambios en su expresión en parte aérea, pero sí el transcrito que codifica la proteína SICIPK12 (Solyc02g072530.1.1), que se vio reprimido. El transcrito que codifica la proteína SICBL1 (Solyc12g015870.2.1), se encontró reprimido en el fruto.

Se ha descrito que la producción de ROS está implicada en los mecanismos de señalización en respuesta a bajas concentraciones de K^+ externas en raíces de Arabidopsis (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004; Shin, R. y col., 2005) y en plantas de tomate (Hernandez, M. y col., 2012). El transcrito con ID Solyc02g079500.2.1, que codifica a una peroxidasa, se encontró reprimido tanto en raíz como en parte aérea. En concreto, se corresponde con el gen *TMP1*, que codifica a una peroxidasa aniónica implicada en la suberización del fruto de tomate (Roberts, E. y Kolattukudy, P.E., 1989). Entre otros transcritos relacionados con la producción de ROS, se encontraron inducidos, tanto en raíz como en parte aérea, 2 transcritos que codifican para enzimas de tipo Glutatión S-transferasa. El transcrito con ID Solyc10g084400.1.1

codifica a la glutatión S-transferasa-L3; y el transcrito con ID Solyc09g011600.2.1 a una glutatión S-transferasa sin caracterizar (Tablas S8 y S9, MS). La parte aérea y el fruto también compartieron transcritos relacionados con la producción de ROS cuya expresión se vio afectada de forma significativa por ayuno de K^+ . El transcrito que codifica a la enzima glutatión peroxidasa GPX1e-2 (Solyc12g056230.1.1) se indujo de forma significativa en la parte aérea (Tabla S9, MS) mientras que se reprimió en el fruto (Tabla S10, MS). Cabría destacar, que los transcritos compartidos en raíz y parte aérea mostraron el mismo perfil de expresión, mientras que, en parte aérea y fruto, el único transcrito compartido, mostró una expresión opuesta.

En raíces de *Arabidopsis* se ha descrito la inducción del transcrito que codifica la peroxidasa de tipo III denominada RCI3 en condiciones de ayuno de K^+ , y la producción de ROS dependiente de dicha peroxidasa, que estaría implicada en la inducción del gen *AtHAK5* en respuesta al ayuno de K^+ (Kim, M.J. y col., 2010). Sin embargo, el transcrito que codifica a la peroxidasa homóloga a RCI3 en tomate, con ID Solyc05g046010, no mostró cambios en su expresión de manera significativa en las raíces sometidas a ayuno de K^+ en el ensayo de RNA-seq realizado. El transcrito con ID Solyc01g006310.2.1, que se observó inducido en raíces de tomate sometidas a ayuno de K^+ (Tabla S20, MS), codifica una peroxidasa cuya expresión se ha visto también inducida en respuesta a hormonas (Gupta, S. y col., 2013).

Numerosas hormonas, como el etileno, el ABA, el JA y la auxina, participan en la señalización en respuesta a distintas deficiencias nutricionales (Rubio, V. y col., 2009). En cuanto a la modificación de la expresión en respuesta al ayuno de K^+ de transcritos que codifican proteínas relacionadas con fitohormonas, se observó que muchos de ellos estarían expresándose de manera significativa en más de una parte de las plantas de tomate. Las plantas sometidas a estreses bióticos o abióticos presentan niveles de etileno más altos, y el papel del etileno en cada tipo de estrés parece ser específico (García, M.J. y col., 2015). La especificidad en la respuesta podría estar determinada por enzimas como la ACS (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintetasa), que juega un papel importante en la biosíntesis del etileno, ya que participa en la síntesis de ACC, precursor del etileno. En *Arabidopsis* se han encontrado nueve isoformas de la ACS, que forman heterodímeros y homodímeros funcionales (Tsuchisaka, A. y Theologis, A., 2004). Cada isoforma tiene una expresión diferencial temporal y espacial, y también responde de forma diferente ante distintos estreses y hormonas (Wang, K.L. y col., 2002). En condiciones de ayuno de K^+ , las ACC sintetasas ACS2 y ACS6 están inducidas en las raíces de *Arabidopsis* (Zimmermann, P. y col., 2004). En raíces de tomate, se observó inducción del transcrito que codifica a una enzima ACS (Solyc01g095080.2.1), y represión del transcrito que codifica para otra enzima ACS (Solyc02g091990.2.1) (Tabla S11,

MS). El transcrito con ID Solyc04g009860.2.1, que codifica a una enzima ACO, también implicada en la ruta de biosíntesis del etileno, se indujo significativamente en respuesta al ayuno de K^+ , en raíz y parte aérea. El transcrito que codifica al receptor de etileno, *SIETRA4* (Solyc06g053710.2.1), se encontró reprimido en raíz, y el transcrito que codifica al transportador de etileno, *SIETR2* (Solyc07g056580.2.1), se encontró reprimido en la parte aérea e inducido en el fruto.

En relación a la auxina, se encontraron numerosos transcritos cuya expresión se modificó de forma significativa. En cuanto a los transcritos presentes en más de una parte de la planta, se vio que el transportador de tipo PIN, con ID Solyc03g031990, estaba reprimido en raíz y parte aérea. El transcrito que codifica a la proteína de respuesta a auxina SISAUR71 (Solyc07g066560.1.1) se encontró fuertemente inducido en raíz y fuertemente reprimido en la parte aérea. El transcrito con ID Solyc08g078510.2.1 que codifica a una proteína involucrada en la síntesis de auxina se encontró inducido de forma significativa en las tres partes de las plantas de tomate sometidas a ayuno de K^+ (Tabla S4, MS), lo que podría indicar la participación de estas hormonas en la señalización por bajo K^+ , no solo en raíz, como se ha descrito en *Arabidopsis* (Kim, 2010) sino en toda la planta de tomate (Tablas S11, S12 y S13, MS).

También la señalización por ABA en respuesta a una deficiencia de K^+ podría estar operando en toda la planta de tomate. El transcrito con ID Solyc08g078510.2.1 codifica a una proteína denominada *Gem-like 5*, cuyo homólogo en *Arabidopsis* codifica a una proteína implicada en la señalización por ABA. Esta proteína contiene un dominio GRAM (*'Glucosyltransferasas, Rab-like GTPase Activators and Myotubularins'*) de tipo GER-5, y parece estar implicada en la regulación de la división celular y desarrollo embrionario (Baron, K.N. y col., 2014). Este transcrito se encontró inducido en las tres partes de la planta (Tabla S4, MS).

Tanto en raíz como en parte aérea, se observó una fuerte inducción de un transcrito (Solyc12g006380.1.1) que codifica una enzima ODD, implicada en la biosíntesis de GAs (Hedden, P. y Kamiya, Y., 1997). Otros 3 transcritos (Solyc03g006880.2.1, Solyc06g082030.2.1 y Solyc02g080120.1.1) que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de GAs mostraron cambios en su expresión de forma significativa en raíz, mientras que se encontraron inducidos 2 transcritos (Solyc01g058040.1.1 y Solyc02g089350.2.1) que codifican enzimas GA 2-oxidadas, implicadas en inactivación de GAs (Thomas, S.G. y col., 1999). En el fruto, se encontró inducido 1 transcrito que codifica al receptor de GAs identificado como SIGID1L2 (Solyc04g079190.2.1) y reprimidos 2 transcritos que codifican proteínas de respuesta a GAs (Solyc06g007890.2.1 y

Solyc04g078200.2.1) (Tablas S12, S13, S14; MS). Estos resultados muestran, que ante un ayuno de K^+ , se podrían estar produciendo cambios en las concentraciones de GAs biológicamente activas en raíz y parte aérea de las plantas de tomate en respuesta a dicha deficiencia.

La regulación transcripcional de genes mediante FTs constituye uno de los tipos de regulación génica implicada en la respuesta a numerosas deficiencias nutricionales. En tomate, de las 34.727 proteínas codificadas, 1.845 se corresponden con FTs, lo que supone un 5,3 % del total (Tomato Genome Consortium, 2012). En los resultados de RNA-seq obtenidos se encontraron más de 100 FTs que mostraron cambios en su expresión de forma significativa en respuesta al ayuno de K^+ , más de 100 en parte aérea y más de 50 en el fruto de plantas de tomate (Figura 106). Los FTs pueden agruparse en distintas familias dependiendo de los dominios de unión a ADN que presentan.

En la raíz, todos los transcritos que codifican FT pertenecientes a las familias C2C2-GATA, C2H2, CBF/YFN, GRAS, HSF, MADS, MYB-related y NAC, se mostraron inducidos tras ayuno de K^+ ; mientras que los pertenecientes a las familias C2C2-Dof, C2C2-YABBY, JMJ y SBP, se encontraron reprimidos.

El FT denominado RAP2.11 perteneciente a la subfamilia ERF, se induce en condiciones de bajo K^+ en raíces de *Arabidopsis* y se une directamente al promotor del gen *AtHAK5*, promoviendo su inducción (Kim, M.J. y col., 2012). El único FT de la familia AP2/ERF inducido en raíz de las plantas de tomate aquí estudiadas (Tabla S14, MS) se corresponde con el transcrito que codifica a SIERF7 (Solyc06g068360.2.1), que también se vio inducido en el fruto (Tabla S16, MS). Se ha descrito que SIERF7 está implicado en la floración de tomate a través de su interacción con la proteína SICIPK2 (Yuasa, T. y col., 2012) y se induce en raíz, parte aérea y fruto en respuesta a ABA y distintos estreses, como frío y daño mecánico (Sharma, M.K. y col., 2010). El transcrito con ID Solyc03g044300.2.1 que codifica a un FT denominado AP2a, se encontró reprimido en raíz e inducido en parte aérea (Tablas S14 y S15, MS). Se ha descrito la participación de AP2a en la maduración del fruto de tomate mediante la regulación de la síntesis y señalización del etileno (Chung, M.Y. y col., 2010; Karlova, R. y col., 2011).

Los estudios de expresión de los FT de respuesta a auxina (ARF), han revelado que muchos de ellos estarían implicados en el proceso de transición de la flor al fruto. Sin embargo, su regulación se ve afectada por auxina y distintas hormonas, sugiriendo conexiones entre los mecanismos de señalización entre hormonas. El FT ARF2 desempeña un papel en la regulación

del gen *AtHAK5* en raíces de *Arabidopsis*, de forma que se encuentra reprimiendo su expresión en condiciones de K^+ . Cuando hay deficiencia de K^+ , ARF es fosforilado, lo que impide su unión al promotor de *AtHAK5* (Zhao, S. y col., 2016). En *Arabidopsis*, la transcripción de *AtARF2* no se ve afectada tras el tratamiento con bajas concentraciones de K^+ , aunque se ha descrito su implicación sobre la regulación de *AtHAK5* (Zhao, S. y col., 2016) mientras que en los resultados de RNA-seq aquí obtenidos, su homólogo en tomate, *SlARF2A* (Solyc03g118290.2.1) se mostró inducido en la raíz en respuesta al ayuno de K^+ (Tabla S14, MS). Este resultado muestra que pueden existir diferencias en los perfiles de expresión de transcritos en respuesta a una deficiencia de K^+ entre plantas de *Arabidopsis* y tomate, y que la forma de actuar de estos FT homólogos puede ser diferente en las dos especies.

Los FT de tipo GRAS (GAI, RGA, SCR) han sido relacionados con la tolerancia a estreses abióticos, puesto que muchos de estos genes se han visto inducidos en respuesta a diferentes estreses (Czikkell, B. y P Maxwell, D., 2007; Ma, H.-S. y col., 2010). La sobreexpresión de *OsGRAS23* de arroz, mejora la tolerancia a la sequía y estrés oxidativo (Xu, K. y col., 2015). El silenciamiento de *SIGRAS6* aumenta la resistencia a enfermedades (Mayrose, M. y col., 2006). *SIGRAS24* participa en procesos del desarrollo en tomate mediante la regulación de la señalización de auxinas y GAs (Huang, W. y col., 2017). La sobreexpresión de *SIGRAS40* mejoró la tolerancia a la salinidad y a la sequía (Huang, W. y col., 2017). En el ensayo de RNA-seq aquí realizado, el transcrito que codifica a *SIGRAS4* (Solyc01g100200.2.1) mostró una fuerte inducción en raíz ($\text{Log}_2 \text{FC} = 5.44$) y parte aérea ($\text{Log}_2 \text{FC} = 13.09$) en las plantas de tomate en respuesta ayuno de K^+ (Tablas S14 y S15, MS). En la parte aérea, el transcrito que codifica a *SIGRAS31* (Solyc05g053420.1.1) también se mostró inducido tras ayuno de K^+ , mientras que *SIGRAS14*, *SIGRAS15*, *SIGRAS48*, *SIGRAS26* y *SIGRAS1* se encontraron reprimidos (Tabla S14, MS). La expresión de *SIGRAS4* en raíz y parte aérea se ha visto incrementada en respuesta a frío, calor y salinidad; la expresión de *SIGRAS15* y *SIGRAS1*, incrementada en respuesta a frío, y la expresión de *SIGRAS14*, incrementada en respuesta a calor, mientras que la expresión de *SIGRAS26* se ha visto reprimida tras la exposición de las plantas de tomate a todos los tratamientos (frío, calor, sequía, salinidad, estrés oxidativo y estrés osmótico) (Huang, W. y col., 2015). Los cambios observados en la expresión de estos transcritos en el ensayo de RNA-seq realizado, podrían indicar la participación de estos FT en la respuesta a un ayuno de K^+ en plantas de tomate, además de participar en la respuesta a los distintos estreses descritos (Huang, W. y col., 2015),

Los FT de tipo MYB participan en distintas funciones en las plantas, como la regulación del metabolismo secundario, respuesta a hormonas y a diferentes estreses. A pesar de la cantidad

de MYB identificados en tomate, muy pocos han sido caracterizados. En *Arabidopsis*, *AtMYB77* se reprime en condiciones de ayuno de K^+ (Shin, R. y Schachtman, D.P., 2004) y estaría implicado en la regulación de la formación de las raíces laterales mediante su interacción con el FT *AtARF7* (Shin, R. y col., 2007). El homólogo de *AtMYB77* en tomate no ha sido identificado.

Las proteínas bHLH (*'basic Hélix-Loop-Helix'*) constituyen una gran familia de FTs y juegan funciones importantes en el metabolismo, fisiología y procesos del desarrollo en plantas. En el genoma de tomate se han identificado 159 genes que codifican proteínas SlbHLHs. En *Arabidopsis*, el transcrito que codifica al FT bHLH121 se induce por bajas concentraciones de K^+ externo y parece regular la transcripción de *AtHAK5* mediante la unión directa a su promotor (Hong, J.P. y col., 2013). El único transcrito que codifica a un FT bHLH inducido en raíces de tomate, se corresponde al transcrito Solyc05g014590.2.1, identificado como *SibHLH076* por Wang, J. y col., (2015), y como *SibHLH132* por Sun, H. y col., (2015). Ninguno de los transcritos que mostraron cambios en su expresión de forma significativa en raíz, parte aérea y fruto de tomate coincidieron (Tablas S13, S14 y S15, MS), indicando que podría existir especificidad en la regulación transcripcional de estas proteínas en las distintas partes de la planta de tomate, en respuesta a ayuno de K^+ . De acuerdo con esta idea, un análisis filogenético entre los genes AtbHLHs de *Arabidopsis* y los bHLHs en tomate, en respuesta a deficiencia de Fe, mostró que existen diferencias en la regulación transcripcional de bHLHs entre *Arabidopsis* y tomate (Sun, H. y col., 2015).

Se ha descrito la participación de los FT de tipo WRKY en la respuesta de la planta de tomate a diferentes estreses abióticos, como frío (Chen, L. y col., 2015), sequía (Karkute, S.G. y col., 2015) y salinidad (Bai, Y. y col., 2018). En el ensayo de RNA-seq realizado, se observó una predominancia de transcritos SIWRKY inducidos, en las tres partes de la planta (Figura 106). De los cuales, 5 transcritos de dicha familia (Solyc04g072070.2.1, Solyc08g067360.2.1, Solyc04g051690.2.1, Solyc09g015770.2.1, Solyc03g095770.2.1) estaban inducidos tanto en raíz como en parte aérea, y 1 transcrito (Solyc05g012770), en parte aérea y fruto. Estos transcritos codifican a los FTs SIWRKY16, SIWRKY45, SIWRKY51, SIWRKY81, SIWRKY80 y SIWRKY4, respectivamente. Se ha observado que *SIWRKY45* se induce en respuesta a frío (Chen, L. y col., 2015), mientras que *SIWRKY4* se reprime en condiciones de sequía (Karkute, S.G. y col., 2015).

Las cascadas de proteínas MAPKs ejercen funciones importantes sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en la respuesta a varios estreses. En tomate, se han

identificado 5 MAPKKs (SIMAPKK1-5) y 89 MAPKKKS (SIMAPKKK1-89) (Wu, J. y col., 2014). La expresión de la mayoría de SIMAPKKKS se ha visto afectada por el tratamiento con distintas hormonas, como auxina (Mockaitis, K. y Howell, S.H., 2000); y las 5 proteínas MAPKKs mostraron inducción en respuesta a frío, calor, sequía y salinidad (Wu, J. y col., 2014), indicando la posible implicación de estas proteínas en la señalización de hormonas y en respuesta a distintos estreses (Wu, J. y col., 2014; Mockaitis, K. y Howell, S.H., 2000). En el ensayo de RNA-seq realizado, se observó en raíz la inducción del transcrito que codifica a la MAPKK identificada como SIMAPKK5 (Tabla S17, MS), lo que podría indicar su participación en la respuesta a ayuno de K^+ , al igual que se ha descrito en la respuesta a frío, calor, sequía y salinidad (Wu, J. y col., 2014). También se ha observado la inducción de dos transcritos que codifican MAPKs, identificadas como SIMAPK4 (Solyc06g005170.2.1) y SIMAPK3 (Solyc06g005170.2.1). En raíces de tomate expuestas a ayuno de K^+ , Pi y Fe, se observó la inducción de dos genes homólogos a los genes que codifican a la proteína MAPK6 y WIPK de *Nicotiana tabacum* (Wang, Y.H. y col., 2002). El alineamiento de las secuencias nucleotídicas correspondiente al gen MAPK6 descrito y la secuencia de SIMAPK4 reveló un 100 % de identidad. El alineamiento de la secuencia de WIPK y de SIMAPK3 reveló un 86 % de similitud, por lo que los transcritos de las proteínas MAPKs identificados en el ensayo de RNA-seq podrían corresponderse con las MAPKs identificadas por Wang, Y.H. y col., (2002). Sin embargo, la MAPKK identificada como MEK1 por Wang, Y.H. y col., (2002) cuya expresión aumentó tras ayuno de K^+ , PO_4^{3-} y Fe, no se corresponde con la SIMAPKK5 identificada en el ensayo de RNA-seq. La fuerte inducción de MEK1 se observó tras una hora de ayuno de los nutrientes (Wang, Y.H. y col., 2002), por lo que esta MAPKK podría estar implicada en la señalización que tiene lugar al inicio de la detección de la ausencia de nutrientes, y otras MAPKKs podrían participar en la señalización transcurrido más tiempo de deficiencia nutricional.

El único transcrito inducido que codifica a un transportador de K^+ en raíces de tomate sometidas a ayuno de K^+ fue *SIHAK5* (Solyc12g005670.1.1), lo que está de acuerdo con estudios previos en tomate (Wang, Y.-H. y col., 2002) en otras especies de plantas (Gierth, M. y col., 2005; Yang, T. y col., 2014; Alemán, F. y col., 2009a) y con los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral mediante ensayos de RT-qPCR (Figuras 55 y 88). En *Arabidopsis*, el transporte de K^+ de raíz a parte aérea se lleva a cabo principalmente por el canal SKOR (Gaymard, F. y col., 1998), cuyo transcrito se reprime en respuesta a bajas concentraciones de K^+ externo (Gaymard, F. y col., 1998; Pilot, G. y col., 2003a). En tomate, el transcrito que

Resultados y Discusión: Capítulo 4

codifica su homólogo, el canal SISKOR (Solyc11g011500.1.1) se vio reprimido en raíces sometidas a ayuno de K^+ , en el ensayo de RNA-seq (Tabla S20, MS), y también se observó este resultado en el ensayo de RT-q PCR realizado en esta Tesis Doctoral (Figura 35). Al igual que *AKT2* se reprime en raíces de *Arabidopsis* por ayuno de K^+ (Pilot, G. y col., 2003a), el transcrito que codifica a su homólogo en tomate (Solyc10g024360.1.1) se vio reprimido en raíces de tomate (Tabla S20, MS). El transcrito Solyc01g094290.2.1 se encontró reprimido tanto en raíz como en parte aérea (Tablas S20 y S21, MS). Este transcrito codifica un transportador de K^+ sin caracterizar en tomate, y sin homólogo identificado en *Arabidopsis*. Tras alinear la secuencia nucleotídica de dicho transcrito con la herramienta BLAST, se obtuvo un porcentaje de identidad del 100 % con la secuencia nucleotídica que codifica una '*predicted*' proteína descrita '*K⁺ efflux antiporter, chloroplastic*', por lo que podría tratarse del transcrito que codifica un transportador de tipo KEA en tomate. Diferentes estudios muestran que la falta de un nutriente conlleva cambios en la transcripción de genes que codifican transportadores de otros nutrientes (Wang, Y.H. y col., 2002; Maathuis, F.J.M. y col., 2003; Nikiforova, V. y col., 2003; Armengaud, P. y col., 2004). En las raíces de tomate ayunadas de K^+ se mostraron reprimido 2 transcritos que codifican transportadores de NO_3^- de alta afinidad similares a NRT2.4 de *Arabidopsis* (Solyc11g069759.1.1 y Solyc06g010250.2.1). También se han observado cambios en la transcripción de genes que codifican transportadores de NO_3^- en raíces de *Arabidopsis* en respuesta a bajas concentraciones de K^+ externas (Armengaud, P. y col., 2004). El transcrito que codifica al transportador de SO_4^{2-} , *SIST1.2* (Solyc12g056930.1.1), se mostró inducido en raíces de tomate, mientras que los transcritos que codifican otro tipo de transportador de SO_4^{2-} , se reprimieron (Tabla S20, MS). Sin embargo, en la parte aérea se observó que estaban inducidos todos los transcritos que codifican transportadores de NO_3^- y de SO_4^{2-} , mientras que los que codifican transportadores de PO_3^- estaban reprimidos (Tabla S21, MS). Los transportadores implicados en el transporte de Mg^{2+} y Zn^{2+} mostraron cambios en su expresión en parte aérea y fruto, pero no en raíz. En concreto, el transcrito Solyc07g065380.2.1 codifica a un transportador de Zn^{2+} , que se mostró inducido en ambas partes. El transportador de Mg^{2+} de tipo MRS2-4, codificado por el transcrito Solyc01g103890.2.1, estaba inducido en la parte aérea, mientras que en el fruto se mostró reprimido (Tablas S21 y S22, MS).

Estos datos sugieren que cambios en la homeostasis de un nutriente en particular conlleva modificaciones en el transporte de otros nutrientes, de forma que se permita mantener el equilibrio en el estado nutricional de toda la planta.

V. CONCLUSIONS

1. NO_3^- , PO_4^{3-} or SO_4^{2-} deficiency reduces low-affinity K^+ uptake capacity of Arabidopsis and tomato plants, probably by repression of the genes encoding the systems for K^+ uptake in the millimolar range of concentrations, AKT1 and LKT1, respectively. These nutrient deficiencies also result in a decreased translocation of K^+ to the shoot in both Arabidopsis and tomato plants, which may be a consequence of the reduction on the expression levels of *AtSKOR* and *SISKOR* genes.
2. NO_3^- , PO_4^{3-} or SO_4^{2-} deficiency induces *AtHAK5* and *SlHAK5* transcription. However, only K^+ deprivation produces functional HAK5-mediated K^+ uptake in Arabidopsis and tomato roots, suggesting the existence of a posttranscriptional regulation of the HAK5 transporters elicited by a low K^+ signal.
3. High Ca^{2+} reverts the repression of high-affinity K^+ uptake produced by high Na^+ in tomato plants. The presence of Ca^{2+} during K^+ starvation reduces the Na^+ -induced plasma membrane depolarization of roots cells. The mechanism by which high Ca^{2+} levels prevent the Na^+ -induced depolarization is not known.
4. Ethylene and ROS signaling play an important role in low K^+ - *SlHAK5* induction in tomato roots. Inhibition of ethylene effect and ROS production result in lower induction of *SlHAK5* gene in response to K^+ deprivation, leading to a reduction of the high-affinity K^+ uptake capacity.
5. The high-affinity K^+ transporter AtHAK5 is regulated at the posttranslational level by phosphorylation. Expression in yeast cells shows that the Ca^{2+} sensors AtCBL1, AtCBL8, AtCBL9 and AtCBL10 together with the AtCIPK23 protein kinase activate AtHAK5 in vivo. In vitro experiments show that the N-terminus of AtHAK5 is phosphorylated by AtCIPK23. Experiments of K^+ uptake and growth measurements in low K^+ medium with Arabidopsis Knock-out mutants confirm the regulatory role of AtCIPK23 in planta.
6. Expression in yeast cells shows that the C-terminus domain of AtHAK5 is necessary for AtHAK5 protein synthesis or stability and seems to be involved in posttranslational regulation as well. Different C-terminus regions could be playing specific roles in its regulation.
7. Another posttranslational regulation of AtHAK5 could involve homomultimerization, as shown by Bimolecular Fluoresce Complementation (BiFC) assays in *N. benthamiana*.
8. Expression in yeast cells shows that the G, Y, G, D residues, present in the N-terminus domain at 67, 70, 71 and 72 positions, respectively, of AtHAK5 amino acid sequence, are individually essential for AtHAK5 functionality and could be shaping the pore region responsible for K^+ ion binding and transport.

Conclusions

9. Cs⁺ present at high external concentrations is toxic to plants, reduces the internal K⁺ concentration and is absorbed by a Ca²⁺-sensitive system. At external micromolar concentrations, Cs⁺ is not toxic to plants but it accumulates in roots and shoots, which may pose a health problem when plants are grown in areas affected by radiocesium pollution. At this range, Cs⁺ is taken up in K⁺-starved tomato plants by a high-affinity Cs⁺ uptake system with similar pharmacological and regulatory properties to the K⁺ transporter SHAK5.
10. The transcriptome analysis of tomato plants exposed to K⁺ deprivation reveals common elements between the Arabidopsis and tomato low-K⁺ signaling pathways in roots. In addition, tomato roots show different components to those described for Arabidopsis roots. K⁺-starved root, shoot and fruit show differentially expressed transcripts that could be further studied.

VI. SUMMARY

1. INTRODUCTION

Potassium (K^+) is an essential nutrient for plants which is absorbed by the roots through specific transport systems. Two systems, the high-affinity K^+ transporter HAK5 and the inward rectifying channel AKT1, have been identified as the major contributors to root K^+ uptake. The activity of these systems is regulated and responds to the environmental conditions.

An important goal in agriculture is the generation of new crop varieties with increased efficient use of K^+ , especially under K^+ deprivation or under abiotic stress conditions, such as salinity. These new varieties will allow reducing the economic and environmental cost of agriculture. Identification of the sensing and signaling mechanisms as well as regulatory mechanisms of those systems will allow generating new tools to improve their functionality and K^+ nutrition. Gaining insights into the mechanism involved in K^+ uptake and their regulation is crucial to develop these new varieties.

2. OBJECTIVES

The main objective was to gain insights into the systems involved in K^+ absorption in plants and their regulatory mechanisms, by taking physiological and molecular approaches. The model plant *Arabidopsis* was used in order to deepen in the knowledge of K^+ uptake and its regulation. Tomato plants were used because it is important to identify such mechanisms in relevant crops. In this context, the specific objectives were:

1. Study of the effects of NO_3^- , PO_4^{3-} or SO_4^{2-} availability on K^+ uptake and its translocation, in *Arabidopsis* and tomato plants, in the millimolar and micromolar ranges of K^+ concentrations.
2. Study of transcriptional and posttranscriptional mechanisms involved in HAK5 regulation in response to K^+ deprivation.
 - 2.1- Characterization of low- K^+ signaling pathway in tomato plants.
 - Ca^{2+} and Na^+ effects on high-affinity K^+ uptake.
 - Role of ethylene and ROS in *SIHAK5* gene transcription.
 - 2.2- Identification of molecular mechanisms involved in posttranscriptional HAK5 regulation.

Summary

3. Characterization of Cs⁺ absorption by tomato roots.
 - 3.1-Study of Cs⁺ effects on high-affinity K⁺ uptake.
 - 3.2-Identification of systems involved in Cs⁺ uptake at millimolar and micromolar range of concentrations.
4. Transcriptome analysis of tomato plants in response to K⁺ deprivation by RNA-seq.
 - 4.1- Identification of up and down-regulated transcripts in root, shoot and fruit, which could be functionally relevant for future studies on K⁺ deprivation signaling and regulation.

3. METHODOLOGY

3.1- Bacterial and yeast strains and media.

The bacterial *E. coli* DH5 α (Hanahan, D., 1985), Top10 (Edwards, A.N. y col., 2011) and GM119 (Arraj, J.A. y Marinus, M.G., 1983) strains were employed for plasmidic DNA propagation.

The K⁺ uptake-deficient yeast (*S. cerevisiae*) strain 9.3 (Bañuelos, M.A. y col., 1995) was employed for functional complementation studies in growth tests and Rb⁺ uptake experiments. Yeast strains were grown routinely on SD medium (Sherman, F., 1991) supplemented with 100 mM K⁺. The MaV203 yeast strain was used for Yeast Two-Hybrid assay.

3.2- Plant material and growth conditions.

Seeds of *Arabidopsis* WT (ecotype Col-0) and of the T-DNA insertion mutants were sterilized and grown in hydroponic culture (Gibeaut, D.M. y col., 1997) consisting of one-fifth Hoagland modified solution. Tomato plants cv. Micro-Tom seeds were pre-hydrated with aerated CaSO₄ solution and germinated in vermiculite at 28 °C. After 7 days, the seedlings were placed in containers with a one-fifth Hoagland modified solution. The pH was adjusted daily to 5.5 and the solutions were renewed weekly. The

Arabidopsis and tomato plants were grown on a conditions-controlled chamber and subjected to different treatments according to the experiment to be carried out.

N. benthamiana plants were grown on soil on a conditions controlled chamber and employed for Bimolecular Complementation Fluorescence assay.

3.3- K⁺/ Rb⁺ depletion experiments in plants and mineral composition determination.

After growing plants in the Hoagland modified solution as described above, the roots were rinsed in a K⁺-free cold solution and transferred to containers with K⁺-free Hoagland modified solution supplemented with K⁺ or Rb⁺, as stated. Samples of the external solution were taken at intervals to determine their K⁺/Rb⁺ concentrations by using a spectrometer (Perkin-Elmer, Waltham). The rates of depletion were calculated from the reduction in K⁺ or Rb⁺ in the external solution per gram of root weight and unit of time.

Plant material was harvested after the nutritional treatments, separated in roots and shoots, dried at 65 °C for 4 days and the dry weight determined. Plant tissues were digested with HNO₃:HClO₄ (2:1) and ions concentrations were determined by ICP analysis (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation).

3.4- Obtaining Arabidopsis mutant lines.

Arabidopsis knockout double mutant *hak5-3 cipk23-5* and *akt1-2 cipk23-5* and the triple mutant *hak5-3 akt1-2 cipk23-5* were obtained by crossing of the corresponding single mutants. The new mutant lines were checked by PCR on genomic DNA with the corresponding primers.

3.5- Rb⁺ uptake experiments and drop test in yeast.

For Rb⁺ uptake rates determination, yeast cells of the 9.3 yeast strain transformed to express the combinations of cDNAs of interest, were grown overnight at 28 °C in YPD medium containing 100 mM K⁺. Cells were centrifuged and resuspended in PA medium without K⁺, and incubated for 6 h at 28 °C and shaking. Then, cells were centrifuged and resuspended in uptake buffer. At zero time, Rb⁺ was added to reach different external concentrations in different flasks. Internal Rb⁺ concentration of acid-extracted cells was determined by atomic emission spectrophotometry with a Perkin Elmer Analyst 400 spectrophotometer and referred to the corresponding dry weight of the cells.

Growth yeast testes in low-K⁺ were performed in PA medium solidified with 2 % agar and supplemented with KCl at different concentrations as indicated in each case.

3.6- Nucleic acids and proteins manipulations.

Several techniques of nucleic acids manipulation were performed, such as genomic and plasmidic DNA isolations, PCR reactions, plasmid constructs, RNA isolation and real-time PCR.

Total membranes from yeast were isolated and their proteins were subjected to immunoblotting assays. Y2H and BiFC assays were performed in order to detect protein-protein interactions *in vivo*.

3.7- RNA-sequencing assay.

Tomato plants cv. Boludo were grown and treated in control and K⁺ deprivation conditions. After 5 days for roots and shoots, and 12 days for fruits, in the treatments, RNA was isolated and sequenced via RNA-seq (performed by BGI-RNA Sequencing Services). This first process was conducted at the CEBAS-CSIC (Spain), and the raw

RNA-seq data were provided for the subsequent analysis during a 3 months stay in Nottingham (UK).

During this stay, a bioinformatic analysis of the RNA-seq data was conducted. With the use of different informatic tools, pre-processing of the reads, mapping and assembly were done, in order to identify transcripts that were differentially expressed as a response of tomato plants to K^+ starvation stress.

4. RESULTS AND DISCUSSION.

4.1- NO_3^- , PO_4^{3-} or SO_4^{2-} deficiency reduced low-affinity K^+ uptake and translocation to shoot in Arabidopsis and tomato plants.

The effect of the NO_3^- , PO_4^{3-} or SO_4^{2-} deficiency on K^+ uptake in the millimolar range of concentrations was studied on Arabidopsis and tomato plants and K^+/Rb^+ depletion experiments, dry weight, mineral composition and different genes expression levels were determined.

These deficiencies reduced low-affinity K^+ uptake capacity of Arabidopsis and tomato plants (Figure 25 and 31), and repressed the genes encoding the systems for K^+ uptake at this range of K^+ concentrations, *AKT1* and *LKT1*, respectively (Figure 29A and 35A). These nutrient deficiencies also resulted in a decreased translocation of K^+ to the shoot in both Arabidopsis and tomato plants (Figure 26 and 34), which may be a consequence of the reduction on the expression levels of the *AtSKOR* and *SISKOR* genes observed (Figure 29B and 35B).

The use of the Arabidopsis *hak5-3 akt1-2* mutant line allowed to determine the effect of nutrient deficiencies on K^+ uptake through alternative systems different from *AKT1*. The results showed that the lack of these nutrients also reduced K^+ uptake in that line (Figure 25), indicating that the activity of a K^+ uptake system different to *AKT1* was also reduced by nutrient deprivation. In tomato plants, a Cs^+ -insensitive system alternative to *LKT1* was also downregulated by nutrient deficiency (Figure 31).

4.2- A low K⁺ signal is required for high-affinity K⁺ uptake through HAK5 transporter.

The deficiencies of NO₃⁻ or PO₄³⁻ induced *AtHAK5* and *SIHAK5* genes transcription (Figure 38 and 43) but high affinity K⁺ uptake by Arabidopsis or tomato roots was not observed (Figure 37 and 42). Contrarily to NO₃⁻ and PO₄³⁻ deficiencies, the lack of SO₄²⁻ did not induce *AtHAK5* or *SIHAK5* expression (Figure 38 and 43) and no high-affinity K⁺ uptake was observed (Figure 37 and 42). Only when plants were deprived of both K⁺ and the other nutrient (-K-N, -K-P or -K-S treatments) high-affinity K⁺ uptake was developed (Figure 37), suggesting the existence of a posttranscriptional regulation of HAK5 elicited by a low K⁺ signal. Although these results support the existence of common pieces for nutrient sensing, specific mechanisms that activate the acquisition of a nutrient in particular seem to exist.

4.3- High Ca²⁺ reverts the repression of high-affinity K⁺ uptake produced by Na⁺ in tomato plants.

Tomato plants were subjected to K⁺ starvation in presence of different Ca²⁺ and Na⁺ concentrations and K⁺ depletion experiments, dry weight, mineral composition and *SIHAK5* gene expression levels as well as root membrane potentials were determined.

The presence of Na⁺ during K⁺ starvation reduced plasma membrane hyperpolarization (Figure 52), eliminating one of the first events in the low K⁺-signaling cascade (Amtmann, A. y col., 2006; Schachtman, D.P. y Shin, R., 2007), resulting in a repression of *SIHAK5* induction (Figure 51), which importantly reduced the capacity of root high-affinity K⁺ uptake (Figure 46). The presence of high Ca²⁺ showed a reduced Na⁺-induced depolarization, allowing higher *SIHAK5* expression levels (Figure 51) and higher rates of high-affinity K⁺ uptake. The results showed that the major contributor to the Ca²⁺- restored K⁺ influx is the *SIHAK5* transporter because NH₄⁺ but not Ba²⁺ importantly inhibited K⁺ uptake (Figure 47). The mechanism by which high Ca²⁺ levels prevent the Na⁺-induced depolarization is not known.

4.4- Ethylene and ROS signaling play an important role in low K⁺- *SIHAK5* induced in tomato roots.

Inhibition of ethylene effect and ROS production results in lower induction of *SIHAK5* gene in response to K⁺ deprivation (Figure 54), leading to a reduction of the high affinity K⁺ uptake capacity (Figure 53). Similarly to Arabidopsis, ethylene and ROS seem to be involved in low K⁺-signaling pathway that results in *SIHAK5* gene induction in tomato plants.

4.5- The high-affinity K⁺ transporter AtHAK5 is regulated at the posttranslational level.

Expression in yeast cells shows that the Ca²⁺ sensors AtCBL1, AtCBL8, AtCBL9 and AtCBL10 together with AtCIPK23 protein activate AtHAK5 in vivo (Figure 62). In vitro experiments show that the N-terminus of AtHAK5 is phosphorylated by AtCIPK23 (Figure 58). Experiments of K⁺ uptake and growth measurements in low K⁺ medium with Arabidopsis mutant lines confirmed the regulatory role of AtCIPK23 in planta (Figure 56 and 60).

Serial deletions of the C-terminus domain of AtHAK5 were expressed in yeast cells and showed that specific residues are necessary for AtHAK5 protein synthesis or stability and that other residues seem to be involved in posttranslational regulation as well (Figure 65 and 66). The different C-terminus regions could be playing specific roles in their regulation.

BiFC assay in *N. benthamiana* leaves transiently expressing AtHAK5 fusions to the two halves of the YFP protein, showed fluorescence emission, indicating homomultimerization of AtHAK5 (Figure 71). Taking this into account, another mechanism of AtHAK5 posttranslational regulation could involve multimerization.

Expression in yeast cells showed that specific residues present in N-terminus domain are individually essential for AtHAK5 functionality at low K⁺ concentrations (Figure 75) and could be shaping the pore region responsible for K⁺ ion binding.

4.6- The high-affinity K⁺ transporter SIHAK5 could be involved in high affinity Cs⁺ uptake in tomato plants.

Previous reports in *Arabidopsis* have shown that the presence of Cs⁺ in the growth medium produced plant growth reduction, K⁺ deficiency and induced *AtHAK5* gene under K⁺-sufficient conditions (Adams, E. y col., 2013). The results presented here in tomato plants showed that K⁺-sufficient plants treated with Cs⁺ did not show high-affinity K⁺ uptake or *SIHAK5* induction (Figures 89 and 91). Cs⁺ present at high concentrations is toxic to plants, reduced the internal K⁺ concentration and is absorbed by a Ca²⁺-sensitive system (Figure 92).

At micromolar concentrations, Cs⁺ is not toxic to plants but it accumulates in roots and shoots (Figure 93), which may pose a health problem when plants are grown in areas affected by radiocesium pollution. At this range, Cs⁺ was taken up in K⁺-starved tomato plants by a high-affinity Cs⁺ uptake system with similar pharmacological and regulatory properties to the *SIHAK5* transporter. Known conditions that repressed *SIHAK5* induction, such as the presence of Na⁺ (Nieves-Cordones, M. y col., 2007; Bacha, H. y col., 2015) abolished high affinity Cs⁺ uptake (Figure 96). Inhibitors of ethylene effect or ROS production, Ag⁺ and DPI, respectively, also abrogated high affinity Cs⁺ uptake (Figure 99) as well as NH₄⁺ presence in the external solution of the Cs⁺ depletion experiment (Figure 95A).

This study on tomato plants showed that at millimolar concentrations, Cs⁺ uptake could take place through a Ca²⁺ sensitive pathway, probably a NSCC, and at micromolar concentrations, Cs⁺ is accumulated by a high-affinity uptake system upregulated in K⁺ starved plants.

4.7- Transcriptome profiling of tomato roots revealed the presence of common elements between the *Arabidopsis* and tomato plants low-K⁺ signaling pathways in roots, and different elements as well. Differentially expressed transcripts of K⁺-starved roots, shoots and fruits could be potential molecular pieces for K⁺ signaling in tomato plants.

Previous reports on *Arabidopsis* transcriptome (Armengaud, P. y col., 2004; Nikiforova, V. y col., 2003) have identified transcripts induced after K⁺ deprivation in roots. Other

studies showed differential expression of other genes in response to K^+ deprivation, including calcium sensors (Cheong, Y.H. y col., 2007), peroxidases (Kim, M.J. y col., 2010) and oxidases (Shin, R. y col., 2005), elements involved in hormone signaling (Jung, J.-Y. y col., 2009), transcription factors (Kim, M.J. y col., 2012; Shin, R. y col., 2007) and nutrient transporters and channels (Wang, Y.H. y col., 2002; Maathuis, F.J.M. y col., 2003; Nikiforova, V. y col., 2003; Armengaud, P. y col., 2004).

In the RNA-seq analysis performed in this Doctoral Thesis in roots, shoots and fruits of K^+ -starved tomato plants the induction of the *SICIPK23* gene in roots was observed. The same result is described in Arabidopsis roots (Cheong, Y.H. y col., 2007), indicating the probable activation in tomato roots of the *SIHAK5* transporter by the *SICIPK23* kinase protein, as observed in yeast (Figure 61). Transcripts encoding peroxidases and oxidases shown different induction levels (Table S8, S9 and S10, MS) in roots, shoots and fruits in response to K^+ deprivation; however, the homolog *RCI3* peroxidase transcript in tomato did not show induction in root, indicating that different elements could be also involved in roots between Arabidopsis and tomato plants.

Enzymes involved in ethylene, auxin, ABA and GAs hormones biosynthesis and signaling showed differentially expressed transcripts in roots, shoots and fruits in K^+ starved tomato plants (Tables S11, S12 and S13, MS). Taking this into account, these hormones could be involved in low- K^+ signaling similarly to Arabidopsis plants. The ethylene effect blocked by Ag^+ and ROS levels decreased by DPI, leaded to *SIHAK5* repression (Figure 54), and reduced high-affinity K^+ absorption in roots (Figure 53), confirming the role of ethylene and ROS production in low- K^+ signaling pathway in tomato plants.

Several genes encoding transcription factors showed changes in their expression levels in response to K^+ deprivation, being more than 250 in roots, shoots and fruits. The differentially expressed genes for transcription factors observed in this Doctoral Thesis were classified in the corresponding family, allowing noticing the family distribution in the different tomato parts (Figure 106).

The *SIHAK5* induction was observed in roots, according to the results already observed in tomato plants (Wang, Y.-H. y col., 2002), in others plants (Gierth, M. y col., 2005; Yang, T. y col., 2014; Alemán, F. y col., 2009a) and in this Doctoral Thesis as shown by RT-qPCR assays (Figures 55 y 88).

Summary

The repression observed in *SISKOR* transcript (Table S20, MS) was also confirmed by the RT-qPCR assay performed here (Figure 35) and it was in agreement with the results observed in *Arabidopsis* (Gaymard, F. y col., 1998).

Transcriptional regulation of transcripts encoding different nutrient transporters was observed (Tables S20, S21 and S22), indicating the existence of a crosstalk among the elements involved in plant response to different nutrient deprivation, as well as an integrated response for nutrient stress adaption in tomato plants.

VII. Material Suplementario

Tabla S1. Lecturas obtenidas de la secuenciación de raíz (R), parte aérea (PA) y fruto (F) de plantas de tomate, para cada una de las réplicas (biológicas y técnicas), tras el paso de pre-procesamiento.

Tratamiento	Réplica Biológica	Réplica Técnica	Lecturas Totales		
			R	PA	F
C	1	1	28.694.802	44.587.506	36.907.966
		2	29.521.800	45.589.108	38.125.992
		3	29.968.646	46.266.610	38.908.796
	2	1	43.030.182	36.019.940	41.611.236
		2	43.887.434	37.253.780	42.994.742
		3	44.204.234	38.179.518	44.063.878
	3	1	46.618.782	36.588.720	32.010.080
		2	47.916.746	37.632.086	32.889.080
		3	48.581.638	38.499.256	33.523.580
-K ⁺	1	1	33.245.868	36.902.616	30.467.298
		2	34.009.466	37.883.286	31.345.896
		3	34.552.148	38.651.872	31.790.794
	2	1	29.093.144	38.229.144	37.225.698
		2	29.869.118	39.261.984	38.340.396
		3	30.426.460	40.069.592	38.816.542
	3	1	46.011.184	39.755.084	29.687.198
		2	47.384.298	40.778.196	30.595.758
		3	47.865.722	41.466.884	31.124.958
Total:			694.881.672	713.615.182	640.429.888

Tabla S2. Porcentaje de alineamiento de las lecturas frente al genoma de tomate.

Muestra	Tratamiento	Réplica Biológica	Lecturas totales	Lecturas alineadas	Alineamiento (%)
R	C	1	88.185.248	77.947.732	88,4
		2	131.121.850	117.488.706	89,6
		3	143.117.166	129.474.610	90,5
	K ⁺	1	101.807.482	89.491.238	87,9
		2	89.388.722	79.477.632	88,9
		3	141.261.204	126.062.224	89,2
PA	C	1	136.443.224	107.623.278	78,8
		2	111.453.238	87.734.442	78,7
		3	112.720.062	88.562.272	78,6
	K ⁺	1	113.437.774	89.376.446	78,8
		2	117.560.720	93.487.532	79,5
		3	122.000.164	96.801.774	79,3
F	C	1	113.942.754	101.479.040	89
		2	128.669.856	115.106.842	89,5
		3	98.422.740	84.866.226	86,2
	K ⁺	1	93.603.988	83.685.818	89,4
		2	114.382.636	101.820.092	89
		3	91.407.914	80.920.266	88,5
		Total	2.048.926.742	1.751.406.170	85,5

Tabla S3. Número de transcritos de cada tipo, obtenidos para cada una de las partes de la planta de tomate.

	Transcritos
Solyc	33.809
MSTRG	22.197
NCRNA	3.851
TRNA	984
RRNA	90
Total	60.931

Tabla S4. Información sobre los transcritos identificados cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en las tres partes de la planta de tomate, tras ayuno de K⁺.

		R	PA	F	
Nº	Transcrito ID	log ₂ FC	log ₂ FC	log ₂ FC	Descripción
1	Solyc01g107400.2.1	3.787678879	3.17616897	1.32507703	<i>Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.8</i>
2	Solyc08g078510.2.1	2.680125574	3.07117131	0.26728793	<i>GRAM-containing/ABA-responsive protein</i>
3	Solyc07g052350.2.1	-0.54807941	-0.8001578	-0.5292073	<i>3-isopropylmalate dehydratase.Aconitase/iron regulatory protein 2</i>
4	Solyc07g006560.2.1	2.2520309	5.88169327	-1.9222801	<i>Hypersensitive response assisting protein</i>
5	Solyc07g061800.2.1	0.357121051	4.50668239	-1.3065274	<i>Heme-binding protein 2</i>
6	Solyc02g089150.2.1	0.304901084	1.35959372	-1.2576771	<i>MAP protein kinase-like protein</i>
7	Solyc08g083110.2.1	0.738089563	1.07300517	-0.9891152	<i>Cystathionine gamma-lyase</i>
8	Solyc05g013820.2.1	0.501745165	1.55885979	-0.2595385	<i>Proteasome subunit beta type</i>
9	Solyc01g096570.2.1	0.377841247	1.06560065	-0.3116693	<i>Exonuclease family protein expressed</i>
10	Solyc10g050060.1.1	1.279969999	1.83681548	-0.4249869	<i>Elicitor-responsive protein 3</i>
11	Solyc03g078370.1.1	2.133004409	-2.3124656	-0.5916256	<i>Receptor-like protein kinase</i>
12	Solyc02g068130.2.1	-1.04993273	3.60368245	0.86349989	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM20</i>
13	Solyc07g056140.2.1	-0.29732887	1.59321552	-0.5356284	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase</i>
14	Solyc10g018600.1.1	-0.09136723	0.65419766	-0.2214713	<i>Cationic amino acid transporter</i>
15	Solyc01g073640.2.1	-1.00844908	3.56370329	-1.7768766	<i>Uncharacterized oxidoreductase</i>
16	Solyc02g070320.2.1	0.810195877	-2.9338856	0.80256612	<i>40S ribosomal protein S4-like protein</i>

Tabla S5. Información sobre los transcritos relacionados con la señalización por Ca²⁺, cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la raíz de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Transcrito	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
Solyc03g083320.2.1	-1.801269799	0.012129431	<i>SICBL4</i>	<i>Calcineurin B-like calcium binding protein</i>
Solyc02g021440.2.1	1.253789693	0.006785181	<i>SICIPK23</i>	<i>CBL-interacting protein kinase</i>
Solyc05g053210.2.1	-0.745155261	0.022260998	<i>SICIPK1</i>	<i>CBL-interacting protein kinase</i>
Solyc01g006840.2.1	-0.884637914	0.023905925		<i>Calcium dependent protein kinase</i>
Solyc01g112170.2.1	0.481515255	0.002859314		<i>Calcium-dependent protein kinase</i>
Solyc03g033540.2.1	1.030978172	0.048990074		<i>Calcium-dependent protein kinase</i>
Solyc01g096820.2.1	-0.476345775	0.031653305		<i>Calcium-dependent protein kinase</i>
Solyc07g064610.2.1	-2.796785528	0.001491889		<i>Calcium-dependent protein kinase</i>
Solyc01g108400.2.1	-1.345949657	0.026790587		<i>Calcium-dependent protein kinase-like</i>
Solyc02g088090.1.1	2.202019411	0.022282712		<i>Calmodulin-like protein</i>
Solyc03g115930.1.1	2.0815241	0.047880606		<i>Calmodulin-like protein</i>
Solyc03g044900.2.1	2.177412932	0.004400104		<i>Calmodulin-like protein</i>
Solyc10g083360.1.1	1.112058403	0.017152364		<i>Calmodulin binding protein</i>
Solyc09g082560.2.1	-1.316061715	0.005251384		<i>Calmodulin binding protein</i>
Solyc10g008790.2.1	-0.127312269	0.019741162		<i>Calmodulin binding protein</i>
Solyc12g008960.1.1	0.53417958	0.042018716		<i>Calmodulin-binding protein</i>
Solyc07g006830.2.1	0.483045194	0.032376154		<i>Calmodulin-binding protein</i>
Solyc03g119250.2.1	1.556333081	0.000440526		<i>Calmodulin-binding protein</i>
Solyc11g011120.1.1	0.650219767	0.001616749		<i>Calmodulin-binding heat-shock protein</i>
Solyc12g036390.1.1	3.493238422	0.00095406		<i>Calmodulin-binding protein-like</i>
Solyc11g012400.1.1	-0.774414188	0.005173324		<i>Calcium-binding protein 39</i>
Solyc02g086890.2.1	-0.547891158	0.012466016		<i>Calcium homeostasis regulator</i>
Solyc10g009280.2.1	1.453230988	0.025571294		<i>Calcium-responsive transcription coactivator</i>

Tabla S6. Información sobre los transcritos relacionados con la señalización por Ca²⁺, cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la parte aérea de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Transcrito	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
Solyc02g072530.1	-2.289830159	0.026676233	SICIPK12	<i>CBL-interacting protein kinase</i>
Solyc04g049160.2	1.721014037	0.045574182		<i>Calcium dependent protein kinase</i>
Solyc01g010020.2	1.178606536	0.006270637		<i>Calmodulin</i>
Solyc10g079420.1	-11.72751104	0.026676233		<i>Calmodulin</i>
Solyc10g077010.1	1.214911216	0.025892753		<i>Calmodulin 2</i>
Solyc01g008950.2	1.235091665	0.022070366		<i>Calmodulin 5/6/7/8-like protein</i>
Solyc02g088090.1	5.182610467	0.009519327		<i>Calmodulin-like protein</i>
Solyc10g083360.1	1.666418929	0.002297422		<i>Calmodulin binding protein</i>
Solyc01g100240.2	1.855748752	0.001502908		<i>Calmodulin-binding protein</i>
Solyc01g060140.2	-0.955302812	0.039015751		<i>Calmodulin-binding transcription activator 5</i>
Solyc01g005400.2	1.595475748	0.017531419		<i>Calcium binding protein Caleosin</i>
Solyc05g054130.2	1.813361825	0.02818663		<i>Calcium-binding protein 39</i>

Tabla S7. Información sobre los transcritos relacionados con la señalización por Ca²⁺, cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en el fruto de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Transcrito	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
Solyc08g077770.2.1	-0.131518811	0.022354843	SICBL1	<i>Calcineurin B-like calcium binding protein</i>
Solyc02g083850.2.1	0.986771273	0.031961931		<i>Calcium-dependent protein kinase</i>
Solyc04g009800.2.1	-0.518479202	0.011609005		<i>Calcium-dependent protein kinase</i>
Solyc01g108400.2.1	0.327937676	0.012382417		<i>Calcium-dependent protein kinase</i>
Solyc01g008950.2.1	-0.288431988	0.015009814		<i>Calmodulin 5/6/7/8-like protein</i>
Solyc06g066430.2.1	0.613019373	0.002611514		<i>Calmodulin-binding family protein</i>
Solyc01g108440.2.1	-0.205155274	0.047411717		<i>Calmodulin-binding protein</i>
Solyc02g079040.2.1	0.402967842	0.027480607		<i>Calmodulin-binding protein</i>
Solyc06g053530.2.1	-0.312529069	0.035771943		<i>Calmodulin-binding protein MPCBP</i>
Solyc01g005400.2.1	0.635462133	0.048902923		<i>Calcium binding protein Caleosin</i>
Solyc04g007960.2.1	0.371340135	0.008293984		<i>Calcium binding protein Caleosin</i>
Solyc04g079300.2.1	0.533187666	0.02645926		<i>Calcineurin-like phosphoesterase family protein</i>
Solyc12g088920.1.1	1.003657344	0.007541512		<i>Calcineurin-like phosphoesterase family protein</i>
Solyc04g009820.2.1	0.931767272	0.011094584		<i>Calcium-responsive transactivator</i>
Solyc04g048900.2.1	1.178511734	0.017894906		<i>Calreticulin 2 calcium-binding protein</i>
Solyc03g059180.2.1	0.15280112	0.022993238		<i>Extracellular calcium sensing receptor Rhodanese-like</i>

Tabla S8. Información sobre los transcritos relacionados con ROS, cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la raíz de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Transcrito	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
Solyc01g006310.2.1	1.728053343	0.011583063		<i>Peroxidase</i>
Solyc01g067870.2.1	1.695687693	0.019949433		<i>Peroxidase</i>
Solyc02g087070.2.1	1.561046616	0.004258828		<i>Peroxidase</i>
Solyc04g080330.2.1	1.188124871	0.026600511		<i>Peroxidase</i>
Solyc11g072920.1.1	1.162119297	0.010478454	<i>SIPOX5</i>	<i>Peroxidase</i>
Solyc02g084790.2.1	0.615818134	0.001065192		<i>Peroxidase</i>
Solyc11g039570.1.1	0.321721912	0.006263284	<i>SIPOX7</i>	<i>Peroxidase</i>
Solyc09g007520.2.1	-0.587658101	0.048615932		<i>Peroxidase</i>
Solyc08g069040.2.1	-1.040119759	0.036401868		<i>Peroxidase</i>
Solyc12g005790.1.1	-1.057656719	0.023726067		<i>Peroxidase</i>
Solyc02g079500.2.1	-1.332949422	0.004596245		<i>Peroxidase</i>
Solyc05g046000.2.1	-1.382268157	0.010079633		<i>Peroxidase</i>
Solyc01g067850.2.1	-1.549787157	0.038142259		<i>Peroxidase</i>
Solyc08g075830.2.1	-1.575940275	0.014953846		<i>Peroxidase</i>
Solyc02g064970.2.1	-1.756568611	0.011962048		<i>Peroxidase</i>
Solyc02g090450.2.1	-2.312270936	3.66E-05		<i>Peroxidase</i>
Solyc09g074850.2.1	4.309854546	0.045681998		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc12g011320.1.1	2.262561217	0.039778442		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc09g011600.2.1	2.061367967	0.000805006		<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>
Solyc09g011540.2.1	2.014842261	0.004446378		<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>
Solyc09g011500.2.1	1.731069086	0.007205462		<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>
Solyc10g084400.1.1	0.91254087	0.020186289	<i>SIGST-L3</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc09g011640.2.1	0.70980624	0.006614385		<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>
Solyc09g091130.2.1	-0.237002086	0.011566614		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc12g056240.1.1	-0.482695187	0.013999262		<i>Glutathione peroxidase</i>

Tabla S9. Información sobre los transcritos relacionados con ROS cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la parte aérea de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Transcrito	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
Solyc08g007150.1.1	1.562959743	0.003933748		<i>Peroxidase</i>
Solyc04g071890.2.1	1.180388844	0.00490807		<i>Peroxidase</i>
Solyc11g010120.1.1	1.147475499	0.027246744		<i>Peroxidase</i>
Solyc02g094180.2.1	-0.2540436	0.026676233		<i>Peroxidase</i>
Solyc03g006810.2.1	-0.766822414	0.030860803		<i>Peroxidase</i>
Solyc02g079500.2.1	-3.590301837	0.024518212		<i>Peroxidase</i>
Solyc09g011490.2.1	13.0888356	0.01562154		<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>
Solyc02g081340.2.1	8.907691858	0.037763173		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc05g006730.2.1	5.092920749	0.006688981		<i>Glutathione S-transferase 3</i>
Solyc09g011600.2.1	3.272678584	0.007284516		<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>
Solyc10g084400.1.1	2.818516011	0.003326177		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc09g007150.2.1	2.779122131	0.007901323		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc12g056250.1.1	2.204345422	0.020828078		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc01g086680.2.1	2.17156987	0.01227462		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc09g011580.2.1	2.029812675	0.008562369		<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>
Solyc06g069040.2.1	0.946594401	0.026402244		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc10g084960.1.1	-0.448295064	0.026676233		<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>
Solyc12g056230.1.1	2.508919244	0.022792899	<i>GPx1e-2</i>	<i>Glutathione peroxidase</i>
Solyc08g006720.2.1	2.709627885	0.014209404		<i>Glutathione peroxidase</i>
Solyc08g080940.2.1	2.558749041	0.028897831		<i>Glutathione peroxidase</i>
Solyc08g081690.2.1	-1.402691522	0.046172567	<i>SIRBOH1</i>	<i>Respiratory burst oxidase</i>

Tabla S10. Información sobre los transcritos relacionados con ROS cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en el fruto de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Transcrito	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
Solyc07g056440.2.1	0.517057308	0.019163933		<i>Glutathione S-transferase-like protein</i>
Solyc04g009530.2.1	-0.270212232	0.023974652		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc08g080910.2.1	-0.380275014	0.027621651		<i>Glutathione S-transferase</i>
Solyc12g056230.1.1	-0.338563566	0.000920406	<i>GPx1e-2</i>	<i>Glutathione peroxidase</i>
Solyc05g025690.1.1	0.359974895	0.015286773		<i>Respiratory burst oxidase-like protein E</i>

Tabla S11. Información sobre los transcritos relacionados con la síntesis, transporte o respuesta a distintas fitohormonas (etileno, ácido jasmónico, auxina, ácido abscísico y giberelinas) cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la raíz de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Hormona	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
ETILENO	Solyc01g095080.2.1	0.42493245	0.01065023	SIACS2	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
	Solyc02g091990.2.1	-0.3665114	0.00427772	SIACS3	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
	Solyc09g089580.2.1	2.08726383	0.00084666		1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like
	Solyc04g009860.2.1	1.39549207	0.01027469		1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like
	Solyc09g089800.1.1	1.37555319	0.04742555		1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like
	Solyc02g071430.2.1	1.32841543	0.0195804		1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
	Solyc11g010400.1.1	-0.47906794	0.00102143		1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
	Solyc06g060070.2.1	-0.80739531	0.0332561		1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
	Solyc11g007890.1.1	-0.81608362	0.01502313		1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 4
	Solyc02g081190.2.1	-1.15699567	0.01649729	SIACO4	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
	Solyc11g010410.1.1	-2.97204769	0.01520501		1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
	Solyc06g053710.2.1	-1.23833779	0.03677337	SIETR4	Ethylene receptor
JA	Solyc12g009220.1.1	4.05991781	0.00029169		Jasmonate ZIM-domain protein 1 (JAZ)
	Solyc03g122190.2.1	0.73672893	0.031104		Jasmonate ZIM domain 2
	Solyc08g036660.2.1	0.36589978	0.00418186		Protein TIFY 5A (JAZ)
AUXINA	Solyc01g107400.2.1	3.78767888	0.00076483		Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.8
	Solyc10g078370.1.1	-0.12412112	0.01591621	SIPIN9	Auxin efflux carrier
	Solyc01g068410.2.1	-0.84493385	0.02722877	SIPIN5	Auxin Efflux Carrier
	Solyc03g031990.2.1	-1.86345254	0.0001289		Auxin efflux carrier family protein PIN-likes 3
	Solyc11g013310.1.1	-0.58040553	0.00513856	SILAX3	Auxin transporter-like protein 3
	Solyc07g066560.1.1	4.68944105	0.00584746	SISAUR71	Auxin responsive SAUR protein
	Solyc11g011630.1.1	0.22149876	0.04775903		Auxin-induced SAUR-like protein
	Solyc01g097290.2.1	-1.13987323	0.02473471	SIIAA16	Auxin responsive protein
	Solyc06g063060.2.1	1.77173867	0.01361067		Auxin-repressed protein
ABA	Solyc06g050500.2.1	-1.46143895	0.03239089	SIPYL4	Abscisic acid receptor PYL4
	Solyc04g071600.2.1	2.71648965	0.03696997		Abscisic stress ripening ASR3-like
	Solyc04g071590.1.1	0.56326985	0.01283474	SIASR3	Abscisic stress ripening
	Solyc08g078510.2.1	2.68012557	0.00178591		GRAM-containing/ABA-responsive protein
GAs	Solyc12g006380.1.1	5.13202345	0.00438789		2-oxoglutarate dependent dioxygenase
	Solyc03g006880.2.1	-0.35042398	0.00450538		Gibberellin 20-oxidase-1
	Solyc06g082030.2.1	0.45017259	0.00338055		Gibberellin 2-beta-dioxygenase
	Solyc02g080120.1.1	-0.71693357	0.04456013		Gibberellin 2-beta-dioxygenase
	Solyc07g061720.2.1	3.88585677	0.00302474		Gibberellin 2-oxidase
	Solyc01g058040.1.1	0.13562382	0.04405438		Gibberellin 2-oxidase
	Solyc02g089350.2.1	-1.07637279	0.00823655		Gibberellin regulated protein

Tabla S12. Información sobre los transcritos relacionados con la síntesis, transporte o respuesta a distintas fitohormonas (etileno, ácido jasmónico, auxina, ácido abscísico y giberelinas) cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la parte aérea de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Hormona	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
ETILENO	Solyc01g067620.2.1	3.77299633	0.01355188		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase</i>
	Solyc04g009860.2.1	3.36449572	0.02393558		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like protein</i>
	Solyc09g089680.2.1	2.60042882	0.00838588		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like protein</i>
	Solyc04g007980.2.1	2.45358593	0.04321827		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase</i>
	Solyc10g086780.1.1	1.11774383	0.03262641		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1</i>
	Solyc09g089770.2.1	0.19586212	0.02958935		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like protein</i>
	Solyc10g076680.1.1	-0.00464925	0.02667623		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase</i>
	Solyc02g068330.1.1	-0.65274171	0.02667623		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 3</i>
	Solyc09g010020.2.1	-5.06551624	0.00637107		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like protein</i>
	Solyc11g072110.1.1	-7.06700825	0.0288167		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like protein</i>
	Solyc09g089610.2.1	-0.27977574	0.03331865	SIETR6	<i>Ethylene receptor</i>
	Solyc07g056580.2.1	-1.12763026	0.0353767	SIETR2	<i>Ethylene receptor</i>
JA	Solyc03g044800.1.1	-1.09821625	0.02667623		<i>Methyl jasmonate esterase</i>
AUXINA	Solyc01g107400.2.1	3.17616897	0.00130484		<i>Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.8</i>
	Solyc02g064830.2.1	-0.64825853	0.02667623		<i>Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.8</i>
	Solyc12g005310.1.1	-1.66675906	0.02466448		<i>Auxin-responsive GH3-like</i>
	Solyc03g031990.2.1	-2.82298971	0.03704807		<i>Auxin efflux carrier family PIN-likes 3</i>
	Solyc02g079190.2.1	-1.25904788	0.0468535		<i>Auxin F-box protein 5</i>
	Solyc05g056430.1.1	11.3349891	0.0311606	SISAUR56	<i>Auxin responsive SAUR protein</i>
	Solyc01g110660.2.1	5.26638637	0.00117149		<i>Auxin-induced SAUR-like protein</i>
	Solyc01g110720.2.1	-0.22016285	0.02667623		<i>Auxin-induced SAUR-like protein</i>
	Solyc01g110620.1.1	-0.25139165	0.02667623		<i>Auxin-induced SAUR-like protein</i>
	Solyc03g082530.1.1	-1.04086582	0.02667623		<i>Auxin-responsive SAUR protein</i>
	Solyc06g053290.1.1	-2.5067149	0.04307582	SISAUR59	<i>Auxin responsive SAUR protein</i>
	Solyc07g066560.1.1	-3.65403893	0.02667623	SISAUR71	<i>Auxin responsive SAUR protein</i>
	Solyc09g083280.2.1	3.33255734	0.02247713	SIIAA1	<i>Auxin responsive protein</i>
	Solyc12g007230.1.1	1.52986694	0.02419738	SIIAA8	<i>Auxin responsive protein</i>
	Solyc06g075690.2.1	1.96031336	0.03716527		<i>Auxin-regulated protein</i>
	Solyc11g073110.1.1	0.49950146	0.02156809		<i>Auxin-regulated protein</i>
	Solyc01g099840.2.1	7.23374896	0.01001114		<i>Auxin-repressed protein</i>
	Solyc06g063060.2.1	1.56619974	0.03709495		<i>Auxin-repressed protein-like protein</i>
ABA	Solyc08g078510.2.1	3.07117131	0.02479517		<i>GRAM-containing/ABA-responsive protein</i>
	Solyc08g082180.2.1	2.51083967	0.03533273	SIPYL9	<i>Abscisic acid receptor PYL9</i>
	Solyc01g095700.2.1	1.62268689	0.01128029	SIPYL8	<i>Abscisic acid receptor PYL8</i>
GAs	Solyc12g006380.1.1	5.24506437	0.01668062		<i>2-oxoglutaratedependent dioxygenase</i>

Material Suplementario

Tabla S13. Información sobre los transcritos relacionados con la síntesis, transporte o respuesta a distintas fitohormonas (etileno, ácido jasmónico, auxina, ácido abscísico y giberelinas) cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en el fruto de plantas de tomate tras 12 días de ayuno de K⁺.

Hormona	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
ETILENO	Solyc09g089690.2.1	-0.40320733	0.01864843		<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like</i>
	Solyc07g056580.2.1	0.56108562	0.04103906	<i>SIETR2</i>	<i>Ethylene receptor</i>
	Solyc12g011330.2.1	-0.23191893	0.03893503	<i>SIETR1</i>	<i>Ethylene receptor</i>
JA	Solyc03g044740.2.1	-1.4060931	0.0156216		<i>Methyl jasmonate esterase</i>
	Solyc06g084120.2.1	-0.43290282	0.002787		<i>Protein TIFY 4B</i>
AUXINA	Solyc01g107400.2.1	1.32507703	0.00794096		<i>Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.8</i>
	Solyc10g079640.1.1	-0.814848	0.01642471		<i>IAA-amino acid hydrolase 9</i>
	Solyc07g048060.1.1	-0.11640503	0.02959743		<i>Auxin-induced protein-like</i>
	Solyc04g010330.2.1	-0.09753693	0.02659971		<i>Auxin-regulated protein</i>
	Solyc11g066380.1.1	-0.98368154	0.01473812		<i>Auxin-regulated protein</i>
	Solyc11g073110.1.1	-0.30649355	0.04158656		<i>Auxin-regulated protein</i>
ABA	Solyc08g078510.2.1	0.26728793	0.03292339		<i>GRAM-containing/ABA-responsive protein</i>
GAs	Solyc04g079190.2.1	0.36874777	0.04379309	<i>SIGID1L2</i>	<i>Gibberellin receptor</i>
	Solyc06g007890.2.1	-1.03235522	0.00473123		<i>Gibberellin regulated protein</i>
	Solyc04g078200.2.1	-1.12451784	0.0225901		<i>Gibberellin-regulated family protein</i>

Tabla S14. Información sobre los transcritos que codifican factores de transcripción cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la raíz de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Familia	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
AP2-ERF	Solyc12g099390.1.1	1.6246429	0.006394781		<i>Protein dehydration-induced 19 homolog 4</i>
	Solyc06g068360.2.1	1.46055181	0.01698313	<i>SIERF.H2</i>	<i>Ethylene-responsive transcription factor</i>
	Solyc08g077240.2.1	-0.60855456	0.02762525		<i>Dehydration-responsive family protein</i>
	Solyc02g064960.2.1	-0.70388023	0.049982237		<i>AP2-like ethylene-responsive transcription factor</i>
	Solyc03g044300.2.1	-0.77826768	0.048369289	<i>SIAP2a</i>	<i>AP2-like ethylene-responsive transcription factor</i>
	Solyc04g071770.2.1	-0.78667338	0.040238458	<i>SIERF.D6</i>	<i>Ethylene responsive transcription factor 2a</i>
	Solyc02g093150.2.1	-0.88184362	0.022754076		<i>AP2-like ethylene-responsive transcription factor</i>
	Solyc01g090340.2.1	-4.95917178	0.014900861	<i>SIERF.B9</i>	<i>Ethylene responsive transcription factor 1b</i>
ARF	Solyc10g083210.1.1	2.05117708	0.013954105		<i>Auxin response factor 1. Transcriptional factor</i>
	Solyc05g056040.2.1	1.79444794	0.014094122	<i>SIARF24</i>	<i>Auxin response factor 14 Transcriptional factor</i>
	Solyc03g118290.2.1	0.57364509	0.017421919	<i>SIARF2A</i>	<i>Auxin response factor 2. Transcriptional factor</i>
	Solyc11g069500.1.1	-0.3753544	0.038847488	<i>SIARF10A</i>	<i>Auxin response factor</i>
	Solyc07g043620.2.1	-0.4832749	0.014790673	<i>SIARF6B</i>	<i>Auxin response factor</i>
bHLH	Solyc05g014590.2.1	1.4236134	0.004407915		<i>BHLH transcription factor.</i>
	Solyc10g079050.1.1	-0.70022807	0.018469912		<i>BHLH transcription factor.</i>
	Solyc09g063010.2.1	-0.85194824	0.035153723		<i>BHLH transcription factor.</i>
	Solyc02g091810.1.1	-0.72781356	0.004625903		<i>BHLH transcription factor.</i>
	Solyc05g006650.2.1	-0.396227	0.029251882		<i>BHLH transcription factor.</i>
	Solyc03g007410.2.1	-0.26012969	0.045407644		<i>BHLH transcription factor.</i>
	Solyc07g052670.2.1	-1.4996076	0.023241346		<i>BHLH transcription factor.</i>
bZIP	Solyc01g111740.2.1	0.68352274	0.001291678		<i>Bzip-like transcription factor-like</i>
	Solyc01g109880.2.1	0.27038598	0.037164991		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc02g083520.2.1	0.04592501	0.001935451		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc08g006870.2.1	-0.65553591	0.043802951		<i>BZIP domain class transcription factor</i>
	Solyc10g050210.1.1	-0.08559844	0.019070786		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc10g078670.1.1	-0.2078726	0.001794934		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc11g006490.1.1	-1.90389255	0.031774987		<i>BZIP transcription factor</i>
CBF/YNF	Solyc01g087240.2.1	1.24913899	0.008776829	<i>SIYNFA-1</i>	<i>Nuclear transcription factor Y subunit A-1. CCAAT-binding transcription factor, subunit B</i>
	Solyc01g079870.2.1	0.43173919	0.024605588	<i>SIYNFC-2</i>	<i>Nuclear transcription factor Y subunit C-2. Transcription factor CBF/NF-Y/</i>
	Solyc04g009520.2.1	0.18835816	0.038815115	<i>SIYNFB-3</i>	<i>Nuclear transcription factor Y subunit B-3. Transcription factor, CBFA/NFYB.</i>
C2C2-DOF	Solyc05g007880.2.1	-1.50490547	0.000217645	<i>SIDOF29</i>	<i>Dof zinc finger protein</i>

Material Suplementario

C2C2-GATA	Solyc06g060940.1.1	0.94331994	0.021738776	SIGATA18	GATA transcription factor 29
C2C2-YABBY	Solyc11g071810.1.1	-0.86674749	0.004490726		CRABS CLAW. YABBY protein
C2H2	Solyc09g008470.2.1	0.92963103	0.004770144		Cys2/His2 zinc-finger transcription factor
	Solyc04g008500.2.1	0.4692618	0.018498647		Cys2/His2 zinc-finger transcription factor
	Solyc02g079920.2.1	0.42825488	0.048664952		Cys2/His2 zinc-finger transcription factor
	Solyc08g063040.2.1	0.39750367	0.044887114		Cys2/His2 zinc-finger transcription factor
	Solyc01g010410.2.1	0.05532959	0.032124331		Cys2/His2 zinc-finger transcription factor
C3HC4-RING	Solyc10g081790.1.1	3.77460986	0.011571783		Ring finger C3HC4 RING-type
	Solyc01g095180.2.1	2.58967708	0.014936092		Ring finger C3HC4 RING-type
	Solyc07g007160.2.1	1.38186768	0.005193975		Ring finger C3HC4 RING-type
	Solyc01g088640.2.1	0.80664698	0.008943434		Ring finger C3HC4 RING-type
	Solyc12g010500.1.1	0.77354371	0.005757469		Ring finger C3HC4 RING-type
	Solyc10g054030.1.1	-0.00815261	0.017028094		Ring finger C3HC4 RING-type
	Solyc07g007200.2.1	-0.74986143	0.003353905		Ring finger C3HC4 RING-type
	Solyc03g095450.2.1	-0.8479408	0.040165258		Ring finger C3HC4 RING-type
	Solyc09g089890.1.1	-2.85850347	0.000384654		Ring finger C3HC4 RING-type
E2F/DP	Solyc10g078430.1.1	0.47120777	0.024982997		Transcription factor Dp-1
	Solyc01g007760.2.1	-0.44029164	0.013152827		Transcription factor E2F
GRAS	Solyc01g100200.2.1	5.44889866	9.02E-05	SIGRAS4	GRAS family transcription factor
HSF	Solyc12g098520.1.1	1.04614502	0.008005376	SIHSFA5	Heat stress transcription factor
IWS	Solyc06g066320.2.1	-0.42541834	0.032605462		Transcription factor IWS1
JMJ	Solyc04g028580.1.1	-0.4102919	0.035011597		Lysine-specific demethylase 5A. Transcription factor jumonji
MADS	Solyc11g030390.1.1	0.92282861	0.023958837		MADS box interactor-like
	Solyc01g106700.2.1	0.87482526	0.00349756		MADS-box transcription factor
MYB	Solyc11g073120.1.1	1.49716439	0.003636827	SIMYB48	MYB transcription factor
	Solyc10g005460.2.1	1.4308176	0.0045919		MYB transcription factor
	Solyc03g116100.2.1	1.16712902	0.001059397		MYB transcription factor
	Solyc01g057910.2.1	1.07398911	0.024022495		MYB transcription factor
	Solyc04g056310.2.1	0.79351254	0.043379092		MYB transcription factor
	Solyc11g011770.1.1	0.62067023	0.048622942		Myb family transcription factor-like
	Solyc05g053330.2.1	0.56090478	0.000518357	SIMYB2	MYB transcription factor
	Solyc04g015290.2.1	0.45669806	0.035321034		Myb family transcription factor
	Solyc12g008800.1.1	0.4528923	0.038875971		MYB transcription factor
	Solyc11g039750.1.1	0.44407478	0.024564706		MYB transcription factor
	Solyc06g065100.2.1	0.43306731	0.039178107		Myb-like transcription factor 1
	Solyc02g036370.2.1	0.41507407	0.033299732		MYB transcription factor

	Solyc12g006800.1.1	0.17416003	0.00077982		<i>Myb family transcription factor-like</i>
	Solyc07g056120.2.1	0.15742606	0.020356485		<i>MYB transcription factor</i>
	Solyc03g006150.2.1	-0.07992507	0.02377704		<i>MYB transcription factor SHAQKYF class family protein</i>
	Solyc06g036300.2.1	-0.29953525	0.010654282		<i>MYB transcription factor</i>
	Solyc10g080460.1.1	-0.75368013	0.046805056		<i>MYB transcription factor</i>
	Solyc06g075660.2.1	-1.1040486	0.044581201		<i>MYB transcription factor</i>
	Solyc12g005800.1.1	-1.11879803	0.032172303		<i>MYB transcription factor</i>
	Solyc06g005310.2.1	-1.45614537	0.000655431		<i>MYB transcription factor</i>
MYB-related	Solyc03g093890.2.1	3.49842937	0.003265716		<i>Myb-related transcription factor</i>
	Solyc09g090130.2.1	3.30668226	0.048454093		<i>Myb-related transcription factor</i>
	Solyc03g093940.1.1	2.00674144	0.004487455		<i>Myb-related transcription factor-like protein</i>
	Solyc06g034000.1.1	1.86689976	1.11E-05		<i>Myb-related transcription factor-like protein</i>
	Solyc12g008670.1.1	1.63478845	0.008818702		<i>Myb-related transcription factor</i>
	Solyc06g033870.1.1	0.18563748	0.012572178		<i>Myb-related transcription factor</i>
NAC	Solyc02g093420.2.1	2.48361723	0.026958674		<i>NAC domain class transcription factor.No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc04g005610.2.1	1.72566841	0.009107273		<i>NAC domain class transcription factor.No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc06g061080.2.1	1.65467163	0.000192291		<i>NAC domain class transcription factor.No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc05g007770.2.1	1.54997489	0.019065809		<i>NAC domain class transcription factor.No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc07g063420.2.1	1.082354	0.03975163		<i>NAC domain class transcription factor.No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc02g087920.2.1	0.67062896	0.014504071		<i>NAC domain class transcription factor.No apical meristem (NAM) protein</i>
NAC-related	Solyc12g013620.1.1	1.17318601	0.00368137		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc07g063410.2.1	1.07246445	0.002099356		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc08g077110.2.1	0.87760841	0.025747023		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc12g056790.1.1	0.82795737	0.001112958		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc10g055760.1.1	0.77166558	0.024479362		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc06g008360.2.1	0.72719357	0.044271047		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc11g068620.1.1	0.69329411	0.041709035		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc06g073050.2.1	0.57273406	0.025565688		<i>NAC domain protein</i>
	Solyc12g017400.1.1	-0.10301783	0.042372758		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM) protein</i>
	Solyc07g053590.2.1	-1.4609882	0.042603407		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM) protein</i>
SBP	Solyc01g080670.2.1	-1.43889734	0.030861423	<i>SISBP7</i>	<i>Squamosa promoter binding protein-like. Transcription factor, SBP-box</i>
WRKY	Solyc04g072070.2.1	2.92975398	0.000558351	<i>SIWRKY16</i>	<i>WRKY transcription factor</i>
	Solyc05g015850.2.1	2.79948133	0.001905238		<i>WRKY transcription factor</i>
	Solyc08g067340.2.1	2.75753446	0.01971521		<i>WRKY transcription factor</i>

Material Suplementario

Solyc08g067360.2.1	2.70722395	0.003796916	<i>SIWRKY45</i>	<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc04g051690.2.1	2.63494056	0.007207969	<i>SIWRKY51</i>	<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc09g015770.2.1	2.02206145	0.009029747	<i>SIWRKY81</i>	<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc03g095770.2.1	1.56856149	0.002147119	<i>SIWRKY80</i>	<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc10g009550.2.1	1.49783683	0.015223804		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc06g066370.2.1	1.21253917	0.007875424		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc09g010960.2.1	1.08283039	0.040346078		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc02g032950.2.1	0.87845009	0.036171239		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc12g011200.1.1	0.74683019	0.006839891		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc02g088340.2.1	0.60769273	0.015109623		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc09g066010.2.1	0.42111037	0.042729683		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc06g070990.2.1	-0.95560991	0.00464597		<i>WRKY transcription factor</i>

Tabla S15. Información sobre transcritos que codifican factores de transcripción cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la parte aérea de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Tipo de FT	Transcrito ID	log2FC	p-valor	Gen	Descripción
AP2-ERF	Solyc12g099390.1.1	2.6805963	0.007216125		Protein DEHYDRATION-INDUCED 19 homolog 4
	Solyc01g065980.2.1	2.21079368	0.032135057	SIERF.E4/SIERF6	Ethylene responsive transcription factor
	Solyc09g075420.2.1	1.90319036	0.039633007	SIERF.E1/LeERF2	Ethylene responsive transcription factor
	Solyc03g044300.2.1	1.36920839	0.013757243		AP2-like ethylene-responsive transcription factor
	Solyc06g035790.2.1	1.13139601	0.030020201		Dehydration-responsive family protein
	Solyc03g116610.2.1	0.82061973	0.004807711	SIERF.A2	Ethylene-responsive transcription factor
	Solyc04g051360.2.1	-0.07384678	0.026676233	SIERF.D1	Ethylene-responsive transcription factor
	Solyc01g009440.1.1	-0.12879751	0.026676233		Ethylene-responsive transcription factor
	Solyc09g066360.1.1	-0.40650828	0.026676233	SIERF.C3	Ethylene-responsive transcription factor
	Solyc10g050970.1.1	-0.60339284	0.018416281	SIERF.D4	Ethylene-responsive transcription factor
	Solyc10g079450.1.1	-1.11850633	0.033728849		Dehydration-responsive protein-like
	Solyc04g049800.2.1	-1.67926215	0.002357372		AP2-like ethylene-responsive transcription factor
	Solyc04g080360.2.1	-2.04045432	0.03557923		Dehydration-responsive family protein
	Solyc04g078640.1.1	-4.90083788	0.029971925		Ethylene-responsive transcription factor
ARF	Solyc07g042260.2.1	-2.36082195	0.016814633	SIARF19	Auxin response factor
	Solyc03g121060.2.1	-2.35739074	0.027360226		Auxin response factor
	Solyc05g047460.2.1	-1.66830208	0.006687722	SIARF7B	Auxin response factor
bHLH	Solyc09g065820.2.1	2.72271617	0.03410912		BHLH transcription factor
	Solyc06g051260.2.1	2.38280298	0.010450152		Transcription factor bHLH
	Solyc10g008270.2.1	1.9279249	0.017987827		BHLH transcription factor
	Solyc03g097820.1.1	1.90175802	0.019416756		BHLH transcription factor
	Solyc01g080050.2.1	1.89008143	0.021282692		BHLH transcription factor
	Solyc12g010170.1.1	1.68152762	0.007597061		BHLH transcription factor
	Solyc08g083170.1.1	0.29346666	0.013428107		BHLH transcription factor
	Solyc06g072520.1.1	-0.54301843	0.026676233		BHLH transcription factor
	Solyc09g063010.2.1	-1.31279582	0.023601456		BHLH transcription factor
	Solyc09g009800.2.1	-2.44730345	0.023048029		BHLH transcription factor
	Solyc10g009290.1.1	-7.96027656	0.026676233		BHLH transcription factor
bZIP	Solyc08g076100.2.1	2.43538974	0.001160578		BZIP transcription factor 3
	Solyc06g060490.2.1	1.92865236	0.029010074		BZIP transcription factor family protein
	Solyc01g104650.2.1	1.78490105	0.028731093		BZIP family transcription factor
	Solyc02g084860.1.1	-0.56885229	0.035908827		BZIP family transcription factor
	Solyc09g005610.2.1	-0.77634419	0.026676233		BZIP family transcription factor

Material Suplementario

	Solyc02g092620.2.1	-0.78399661	0.00512809		<i>BZIP domain class transcription factor</i>
	Solyc10g078290.1.1	-7.11006503	0.024869724		<i>BZIP family transcription factor</i>
	Solyc04g082890.2.1	-16.5195134	0.033570768		<i>BZIP transcription factor protein (</i>
CBF/YNF	Solyc03g114400.2.1	5.25887663	0.046790137		<i>Nuclear transcription factor Y subunit B-3. ranscription factor CBF/NF-Y</i>
	Solyc04g049910.2.1	-0.68623089	0.03773229		<i>Nuclear transcription factor Y subunit B-3. CBFA/NFYB</i>
	Solyc05g005390.1.1	-0.05733853	0.026676233		<i>Nuclear transcription factor Y subunit B-6. Transcription factor, CBFA/NFYB</i>
	Solyc05g015330.1.1	-3.12964513	0.010825574		<i>Nuclear transcription factor Y subunit C-1. Transcription factor CBF/NF-Y</i>
C2C2-DOF	Solyc11g072500.1.1	-0.2304276	0.026676233		<i>Dof zinc finger protein 12</i>
	Solyc03g121400.1.1	-2.2938325	0.026823601		<i>Dof zinc finger protein 4</i>
C2C2-GATA	Solyc10g047640.1.1	6.68512029	0.040042951	SIGATA27	<i>GATA transcription factor 25</i>
C2C2-YABBY	Solyc12g009580.1.1	1.71487114	0.042312655		<i>CRABS CLAW.YABBY protein</i>
C2H2	Solyc05g050860.1.1	-0.05686794	0.026676233		<i>Cys2/His2 zinc-finger transcription factor</i>
	Solyc11g062060.1.1	-0.08394761	0.026676233		<i>Cys2/His2 zinc-finger transcription factor</i>
	Solyc05g009180.1.1	-0.50498473	0.022551324		<i>Cys2/His2 zinc-finger transcription factor</i>
	Solyc04g014540.1.1	-3.07324957	0.026676233		<i>Cys2/His2 zinc-finger transcription factor</i>
C3HC4-RING	Solyc01g107290.2.1	4.82416697	0.038733018		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc06g049030.2.1	4.25810206	0.018469227		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc10g081110.1.1	1.60557867	0.010463041		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc01g098750.2.1	1.56678181	0.047183926		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc03g096930.2.1	1.14961414	0.037210751		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc02g085270.1.1	-0.08725267	0.026676233		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc11g005290.1.1	-0.12879751	0.026676233		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc03g114190.1.1	-0.3768774	0.026676233		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc01g105620.2.1	-0.51252939	0.027424287		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc01g104260.2.1	-1.77220252	0.013805876		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc01g109200.2.1	-2.97948204	0.026676233		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
	Solyc04g081890.1.1	-5.1841693	0.026676233		<i>RING finger family protein C3HC4 RING-type</i>
GRAS	Solyc01g100200.2.1	13.0929723	0.009651257	SIGRAS4	<i>GRAS family transcription factor</i>
	Solyc05g053420.1.1	0.50683115	0.013853521	SIGRAS31	<i>GAI-like protein 1. GRAS transcription factor</i>
	Solyc04g081170.2.1	-0.01995302	0.026676233		<i>GAGA-binding transcriptional activator</i>
	Solyc04g014830.1.1	-0.11082999	0.026676233	SIGRAS14	<i>GRAS family transcription factor</i>
	Solyc10g074680.1.1	-0.261095	0.035365242	SIGRAS15	<i>SCARECROW. GRAS transcription factor</i>
	Solyc11g013150.1.1	-0.55208825	0.002016593	SIGRAS48	<i>GRAS family transcription factor</i>
	Solyc02g092570.1.1	-1.00481835	0.026676233	SIGRAS26	<i>GRAS family transcription factor</i>
	Solyc11g012510.1.1	-1.13154143	0.026676233	SIGRAS1	<i>GRAS family transcription factor</i>
IWS1	Solyc06g066320.2.1	-0.91256692	0.011774375		<i>Transcription factor iws1</i>

JMJ	Solyc04g028580.1.1	-0.41083718	0.020926916		<i>Lysine-specific demethylase 5A. Transcription factor jumonji</i>
MADS	Solyc07g052700.2.1	4.47475062	0.015082743		<i>MADS-box transcription factor 1</i>
	Solyc03g114830.2.1	1.7073769	0.016631164		<i>MADS box transcription factor</i>
	Solyc05g015720.1.1	0.93961342	0.047419272		<i>MADS box transcription factor-like protein</i>
	Solyc01g097850.1.1	0.55816293	0.040656794		<i>MADS-box transcription factor 31 (A)</i>
	Solyc03g033900.1.1	-0.1473697	0.026676233		<i>MADS-box protein</i>
	Solyc11g020320.1.1	-0.23767794	0.024016007		<i>Transcription factor MADS-box</i>
	Solyc01g093960.2.1	-0.54700663	0.026676233		<i>MADS box transcription factor</i>
MYB	Solyc08g082890.2.1	2.45258467	0.036040601		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc10g086250.1.1	2.00254676	0.006680252	<i>SIMYB90</i>	<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc05g007890.2.1	1.86795884	0.006988296		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc04g078420.1.1	1.22579839	0.028105697	<i>SIMYB70</i>	<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc10g081490.1.1	0.97644932	0.032865178		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc02g067760.2.1	-0.05815049	0.026676233		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc04g077260.2.1	-0.19084424	0.026676233		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc07g054840.2.1	-0.45511464	0.026676233		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc12g089190.1.1	-0.5282721	0.026676233		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc06g071690.2.1	-0.7457791	0.018849454		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc04g079600.2.1	-1.75022836	0.04460872		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc06g076770.2.1	-3.33477774	0.026676233		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc09g014250.2.1	-4.97574955	0.026676233		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc01g111500.2.1	-7.44583323	0.027488806		<i>Myb family transcription factor</i>
NAC	Solyc08g077110.2.1	4.90253448	0.000301841		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
	Solyc10g055760.1.1	3.71537645	0.014471797		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
	Solyc03g097650.2.1	1.75238145	0.002163856		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
	Solyc02g061780.2.1	1.45256206	0.037341146		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
	Solyc06g065410.2.1	0.33274166	0.044024303		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
	Solyc06g063380.1.1	-0.10939471	0.026676233		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
	Solyc02g069960.2.1	-0.20812151	0.026676233		<i>NAC domain protein</i>
	Solyc03g062670.1.1	-0.37305358	0.026676233		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
	Solyc11g018660.1.1	-0.64489259	0.029149482		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
TCP-CYCLOIDEA	Solyc05g012840.1.1	-0.06054382	0.026676233		<i>CYCLOIDEA. Transcription factor, TCP</i>
WRKY	Solyc01g095630.2.1	6.69584508	0.026889408		<i>WRKY transcription factor</i>
	Solyc09g015770.2.1	3.92313352	0.006783037		<i>WRKY transcription factor</i>
	Solyc03g095770.2.1	3.72072928	0.048804972		<i>WRKY transcription factor</i>
	Solyc08g067360.2.1	3.61926725	0.008492771		<i>WRKY transcription factor</i>
	Solyc04g072070.2.1	3.2600978	0.002185642		<i>WRKY transcription factor</i>

Material Suplementario

Solyc07g056280.2.1	3.13394975	0.004434202		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc04g051690.2.1	2.50288535	0.045700427		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc03g116890.2.1	1.71232383	0.041706444		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc05g012770.2.1	1.43907954	0.041146369	<i>SlWRKY4</i>	<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc02g094270.1.1	-0.03131509	0.03977206		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc12g042590.1.1	-0.64070127	0.045146942		<i>WRKY transcription factor</i>
Solyc07g065260.2.1	-1.84213914	0.040936739		<i>WRKY transcription factor</i>

Tabla S16. Información sobre transcritos que codifican factores de transcripción cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en el fruto de plantas de tomate tras 12 días de ayuno de K⁺.

FT	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor		Descripción
AP2/ERF	Solyc06g068360.2.1	0.33833254	0.046711242	<i>SIERF.H2</i>	<i>Ethylene-responsive transcription factor</i>
	Solyc04g077490.2.1	-0.29081359	0.017361903		<i>AP2-like ethylene-responsive transcription factor</i>
ARF	Solyc11g069190.1.1	0.86328471	0.003855434	<i>SIARF4</i>	<i>Transcriptional factor B3</i>
	Solyc02g090710.2.1	0.72849966	0.001390916		<i>Auxin response factor</i>
	Solyc01g081400.2.1	-0.28962943	0.017875683		<i>Auxin response factor. Transcriptional factor B3</i>
	Solyc03g121060.2.1	-0.61376446	0.020307729	<i>SIIAA26</i>	<i>Transcriptional factor B3</i>
bHLH	Solyc01g086870.2.1	0.42495961	0.023003868	<i>SibHLH010</i>	<i>BHLH transcription factor</i>
	Solyc02g076920.2.1	-0.29697418	0.031987627	<i>SibHLH028</i>	<i>Transcription factor MYC2 Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH</i>
	Solyc10g006510.2.1	-0.21244637	0.032864815	<i>SibHLH138</i>	<i>Transcription factor Helix-loop-helix DNA-binding</i>
	Solyc05g005810.2.1	-0.43727087	0.030270436		<i>Uncharacterized basic helix-loop-helix protein</i>
bZIP	Solyc10g078670.1.1	1.95979311	0.018884153		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc08g068100.2.1	1.22470827	0.026742454		<i>Bzip-like transcription factor-like</i>
	Solyc06g065040.2.1	0.99042052	0.046755387		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc10g080410.1.1	0.89062426	0.032727088		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc09g007100.2.1	0.5852293	0.012452072		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc04g011670.2.1	0.55328611	0.039689931		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc01g104650.2.1	0.39200929	0.013946781		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc03g005350.2.1	0.3030239	0.045630674		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc09g005610.2.1	0.25426568	0.042642321		<i>BZIP transcription factor</i>
	Solyc07g047830.2.1	-0.02765647	0.002714866		<i>Bzip-like transcription factor-like</i>
	Solyc11g006490.1.1	-0.12811248	0.011908126		<i>BZIP transcription factor family protein</i>
	Solyc04g081190.2.1	-0.91907118	0.038799051		<i>BZIP transcription factor family protein expressed</i>
CBF/YNF	Solyc01g006930.2.1	0.49363792	0.033837975		<i>Nuclear transcription factor Y subunit A-2. CCAAT-binding transcription factor, subunit B</i>
	Solyc03g114400.2.1	0.31795824	0.039065298		<i>Nuclear transcription factor Y subunit B-3. CBF/NF-Y</i>
	Solyc06g009010.1.1	-0.07954172	0.048480381		<i>Nuclear transcription factor Y subunit B-3. CBFA/NFYB</i>
C2C2-GATA	Solyc01g106040.2.1	0.44337895	0.013843225	<i>SIGATA5</i>	<i>GATA transcription factor</i>
	Solyc02g085190.1.1	-0.19750266	0.001013722	<i>SIGATA8</i>	<i>GATA transcription factor</i>
	Solyc03g120890.2.1	-1.21632306	0.047386697	<i>SIGATA12</i>	<i>GATA transcription factor</i>
C2H2	Solyc04g014540.1.1	-0.51672306	0.042161634		<i>Zinc finger protein 7 C2H2-type</i>
	Solyc04g014540.1.1	-0.51672306	0.042161634		<i>Zinc finger protein 7. C2H2-type</i>
	Solyc04g081370.2.1	-0.65055091	0.048019516		<i>Transcription factor C2H2-type</i>
E2F/DP	Solyc10g078430.1.1	0.1718179	0.035398246		<i>Transcription factor Dp-1</i>
FAR-1	Solyc03g121630.2.1	-0.01874618	0.040756845		<i>Protein FAR1-RELATED SEQUENCE 4. Transcription factor, FAR1-related</i>

Material Suplementario

	Solyc03g083920.1.1	-0.0371437	0.040443102		<i>Protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5 Zinc finger, SWIM-type</i>
HSF	Solyc03g097120.2.1	0.62463951	0.008493128	<i>SIHSFA1b</i>	<i>Heat stress transcription factor A3</i>
JMJ	Solyc09g065690.2.1	0.41080003	0.036301292		<i>Transcription factor jumonji (JmjC) Transcription factor jumonji/aspartyl beta-hydroxylase</i>
MADS	Solyc07g052700.2.1	-1.27754621	0.029975956		<i>Transcription factor, MADS-box</i>
MYB	Solyc01g009070.2.1	0.42467528	0.013178534		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc04g064540.2.1	0.30124221	0.02258584		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc03g112890.1.1	-0.1544954	0.031456811		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc07g052490.2.1	-0.24620038	0.039128784		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc03g005570.2.1	-0.36935185	0.017136509		<i>Myb-related transcription factor</i>
	Solyc06g076840.1.1	-0.39577369	0.021134322		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc12g099130.1.1	-0.51101007	0.003256288		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc02g080860.1.1	-0.70068675	0.020932073		<i>Myb family transcription factor</i>
	Solyc04g014470.2.1	-0.74651495	0.04859695		<i>Myb family transcription factor</i>
NAC	Solyc10g005010.2.1	4.55424439	0.048582741		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
	Solyc06g061080.2.1	0.5411416	0.033153896		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
	Solyc12g056790.1.1	-0.1466405	0.033116525		<i>NAC domain protein. No apical meristem (NAM)</i>
TFII	Solyc06g076390.2.1	-0.29138237	0.037127259		<i>Transcription initiation factor IIA subunit</i>
WD40	Solyc09g009710.2.1	-0.35156715	0.000522328		<i>General transcription factor 3C polypeptide 2. WD40 repeat-like</i>
WRKY	Solyc01g079360.2.1	0.99511848	0.001226893		<i>WRKY transcription factor</i>
	Solyc05g012770.2.1	0.22507978	0.00440883		<i>WRKY transcription factor</i>

Tabla S17. Información sobre transcritos que codifican proteínas de tipo MAPKs y HSPs, cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la raíz de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Tipo	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
MAPKs	Solyc06g005170.2.1	0.61271749	0.004161379	SIMAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3
	Solyc02g089150.2.1	0.30490108	0.007978807	PLC-like	MAPprotein kinase-like protein. PLC-like phosphodiesterase
	Solyc03g019850.2.1	0.26103831	0.017225254	SIMAPKK5	MAP kinase
	Solyc11g072630.1.1	0.25278637	0.019417836	SIMAPK4	Mitogen-activated protein kinase
HSP	Solyc09g011710.2.1	1.22077429	0.001622574		Class I heat shock protein 3. HSP20-like chaperone
	Solyc08g078700.2.1	0.75976653	0.035603442		Heat shock protein 22. Heat shock protein Hsp20
	Solyc02g062350.2.1	0.38433601	0.005617859		Heat shock protein DnaJ domain protein
	Solyc07g064020.2.1	-0.28380129	0.041283819		Class I heat shock protein 1. HSP20-like chaperone

Tabla S18. Información sobre transcritos que codifican proteínas de tipo MAPKs y HSPs, cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en parte aérea de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Tipo	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
MAPKs	Solyc12g019460.1.1	1.20328833	0.009611248	SIMAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1. JNK MAP kinase
	Solyc02g089150.2.1	1.35959372	0.010444103	PLC-like	MAPprotein kinase-like protein
	Solyc07g056350.2.1	-1.27933984	0.025704809	SIMAPK12	Mitogen activated protein kinase
HSP	Solyc08g078720.2.1	13.1056924	0.026572846		Heat shock protein. HSP20-like chaperone
	Solyc03g082420.2.1	3.45634994	0.021750524		Heat shock protein Heat shock protein Hsp20
	Solyc04g011440.2.1	1.76958011	0.002977773		Heat shock protein 70
	Solyc04g072250.2.1	-0.21079677	0.026676233		Class I heat shock protein 1. Heat shock protein Hsp20
	Solyc11g006650.1.1	-0.66348469	0.040845656		Heat shock protein 101.
	Solyc06g076560.1.1	-1.89529616	0.026676233		Class I heat shock protein. Heat shock protein Hsp20
	Solyc01g111750.2.1	-2.12028839	0.034366518		Heat shock protein DnaJ domain protein.
	Solyc05g010670.2.1	-2.61318333	0.042184922		Chaperone protein htpG. Heat shock protein Hsp90

Material Suplementario

Tabla S19. Información sobre transcritos que codifican proteínas de tipo MAPKs y HSPs, cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en el fruto de plantas de tomate tras 12 días de ayuno de K⁺.

Tipo	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
MAPKs	Solyc11g006000.1.1	-0.16129804	0.003532013	<i>SIMAPKKK80</i>	<i>Mitogen activated protein kinase kinase kinase</i>
	Solyc07g056350.2.1	-0.54116715	0.021022868	<i>SIMAPK12</i>	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
	Solyc02g089150.2.1	-1.25767706	0.036398669	<i>PLC-like</i>	<i>MAPprotein kinase-like protein</i>
HSPs	Solyc04g072250.2.1	2.35436357	0.004045065		<i>Class I heat shock protein 1. Heat shock protein Hsp20</i>
	Solyc09g005120.2.1	0.34157375	0.028557043		<i>Chaperone protein DnaJ. Heat shock protein DnaJ</i>
	Solyc07g005820.2.1	0.19836683	0.043404898		<i>Heat shock protein 70</i>
	Solyc06g005440.1.1	0.04574515	0.025654921		<i>Heat shock protein 70</i>
	Solyc09g007630.2.1	-0.16441422	0.028573508		<i>Molecular chaperone, heat shock protein, Hsp40, DnaJ</i>
	Solyc11g006650.1.1	-0.35393612	0.00013693		<i>Heat shock protein 101</i>

Tabla S20. Información sobre transcritos que codifican transportadores/ canales de iones cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la raíz de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Ion	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
Potasio (K ⁺)	Solyc12g005670.1.1	3.97141493	0.002323457	SIHAK5	Potassium transporter
	Solyc01g094290.2.1	-0.61413667	0.012879787	SIKEA2	K ⁺ efflux antiporter
	Solyc10g024360.1.1	-0.71604441	0.036744788	LKT2	Potassium channel
	Solyc05g007020.2.1	-1.13391631	0.000279208		Potassium voltage-gated channel subfamily H member 1. LOV/LOV protein
	Solyc11g011500.1.1	-2.07234941	0.000822134	SISKOR	Potassium channel
Nitrato (NO ₃ ⁻)	Solyc11g069750.1.1	-0.75290642	0.007622915		High affinity nitrate transporter
	Solyc06g010250.2.1	-0.83572967	0.029528395		High affinity nitrate transporter
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	Solyc12g056930.1.1	0.24203949	0.049159858	SIST1.2	High affinity sulfate transporter
	Solyc12g056920.1.1	-0.51254699	0.03726738		Low affinity Sulfate transporter
	Solyc09g082550.2.1	-0.93143979	0.002374804		High affinity sulfate transporter
Sodio (Na ⁺)	Solyc03g006260.2.1	0.72900922	0.020641946	NCL-like	Sodium/calcium exchanger family protein
	Solyc01g067710.2.1	-0.55933505	0.006969976	NHX3	(Sodium/potassium)/proton exchanger 3 (NHX3)
	Solyc01g005020.2.1	-0.6294047	0.029822592	SISOS1	Sodium/hydrogen exchanger Na ⁺ /H ⁺ antiporter
Calcio (Ca ²⁺)	Solyc07g065300.1.1	1.05312904	0.041330272	SIACA12	Calcium-transporting ATPase
	Solyc01g097510.2.1	0.60492655	0.00869056	SIANN3	Annexin 3
	Solyc07g056110.2.1	0.43832666	0.019652336	CAX	Vacuolar calcium/proton exchanger family protein
	Solyc12g094420.1.1	0.22765608	0.03206619		Mechanosensitive ion channel
	Solyc10g079300.1.1	-0.12709948	0.012659914	SIACA11	Calcium-transporting ATPase
Cloruro (Cl ⁻)	Solyc07g007690.2.1	-0.7975608	0.022472948	SICLC-G	Voltage-gated chloride channel
	Solyc02g068080.2.1	-1.19152693	0.017979893	SICLC-B	Voltage-gated chloride channel
Canales no selectivos de iones (NSCC)	Solyc01g095770.2.1	1.52349365	0.007643332	SICNGC1	Cyclic nucleotide gated channel
	Solyc05g050350.1.1	1.12181357	0.000705366	SICNGC3	Cyclic nucleotide gated channel
	Solyc07g006510.2.1	0.58080501	0.008572988	SICNGC12	Cyclic nucleotide gated channel

Tabla S21. Información sobre transcritos que codifican transportadores/canales de iones cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en la parte aérea de plantas de tomate tras 5 días de ayuno de K⁺.

Ion	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
Potasio (K ⁺)	Solyc10g076860.1.1	1.05510706	0.03581497		Potassium channel voltage dependent
	Solyc01g094290.2.1	-2.35426176	0.011958749	SIKEA2	K ⁺ efflux antiporter
Nitrato (NO ₃ ⁻)	Solyc08g061010.2.1	1.46296476	0.016580061		Nitrate transporter NRT1/ PTR FAMILY 6.2-like
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	Solyc05g054740.2.1	3.30487434	0.009414222	SIST4.1	High affinity sulfate transporter 4.2-like
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	Solyc06g066070.1.1	-0.23578207	0.016827795		Phosphate translocator protein
	Solyc09g090070.1.1	-0.62357929	0.026676233		Inorganic phosphate transporter
Zinc (Zn ²⁺)	Solyc07g043230.2.1	3.30485143	0.003171547		Low affinity zinc transporter
	Solyc07g065380.2.1	3.02596186	0.00717942		Zinc transporter
	Solyc04g008340.2.1	1.50105409	0.031418995		Zinc transporter
	Solyc05g053370.2.1	-1.74736961	0.022325026		Zinc transporter protein
Cobre (Cu ⁺²⁺)	Solyc02g082080.1.1	20.2477427	0.009554724		High affinity copper uptake protein
	Solyc08g061580.2.1	-0.18867304	0.026676233		Copper-translocating P-type ATPase family protein expressed
Magnesio (Mg ²⁺)	Solyc01g103890.2.1	1.22854954	0.009671894		Magnesium transporter MRS2-4
	Solyc06g009130.2.1	-2.56523865	0.037318635		Magnesium/proton exchanger MHX-like
Canales no selectivos de iones (NSCC)	Solyc12g005400.1.1	1.26182075	0.040958886	SICNGC18	Cyclic nucleotide gated channel
	Solyc03g098210.2.1	-0.16333126	0.026676233	SICNGC15	Cyclic nucleotide gated channel
	Solyc12g010010.1.1	-1.23930961	0.005309092	SICNGC8	Cyclic nucleotide gated channel
	Solyc07g005590.2.1	-3.89628906	0.014785914	SICNGC7	Cyclic nucleotide gated channel

Tabla S22. Información sobre transcritos que codifican transportadores/canales de iones cuya expresión se induce/reprime de forma significativa en el fruto de plantas de tomate tras 12 días de ayuno de K⁺.

Ion	Transcrito ID	log ₂ FC	p-valor	Gen	Descripción
Potasio (K ⁺)	Solyc01g010080.2.1	0.77116751	0.01585203	SIKC1	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4
Nitrato (NO ₃ ⁻)	Solyc06g060620.2.1	-0.75114102	0.044023095		Nitrate transporter
Calcio (Ca ²⁺)	Solyc06g006110.2.1	0.71496638	0.005381012	CAX3	Calcium/proton exchanger
	Solyc07g056110.2.1	0.07809905	0.01702576	CAX5	Calcium/proton exchanger
	Solyc02g090560.2.1	0.16368464	0.017336052		Calcium-transporting ATPase E1-E2 type
Zinc (Zn ²⁺)	Solyc07g065380.2.1	0.23636023	0.04690133		Zinc transporter
	Solyc02g081600.2.1	0.48652017	0.026255036		Zinc transporter protein
	Solyc08g065190.2.1	-0.72811544	0.032490568		Zinc transporter protein
Magnesio (Mg ²⁺)	Solyc01g103890.2.1	-0.17062331	0.021312071		Magnesium transporter MRS2-4
Sodio (Na ⁺)	Solyc11g044540.1.1	-0.19991139	0.03866523		Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaD
	Solyc01g098190.2.1	-0.6785019	0.040184622	NHX4	Sodium/hydrogen exchanger
	Solyc01g067710.2.1	-0.50731865	0.020965199	NHX3	Sodium/hydrogen exchanger
Cloruro (Cl ⁻)	Solyc10g005690.2.1	-0.38137748	0.016882808		Chloride channel, voltage gated

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

ABA	Ácido abscísico (del inglés, ' <i>ABscisic Acid</i> ')
AcK	Acetato de potasio
AcNa	Acetato de sodio
AD	Dominio de activación
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosín difosfato
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
BD	Dominio de unión (del inglés, ' <i>Binding Domain</i> ')
BiFC	Complementación Bimolecular Fluorescente
bp	Par(es) de bases
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
cm	Centímetro
Col-0	Arabidopsis thaliana, ecotipo columbia
C_T	' <i>Threshold Cycle</i> '
C-t	Dominio C-terminal
dNTPs	desoxinucleósidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DPI	difenil diodinio
DTT	Ditiotreitol
EAA	Espectrometría de absorción atómica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF-1α	Fctor de elongación 1a
EK	Potasio de alta disponibilidad (del inglés exchangeable potassium)
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
FC	' <i>Fold Change</i> '
FT	Factor de Transcripción
g	Gramo
GST	Glutación S-transferasa
GTE	Glucosa-Tris-EDTA
h	Hora
H⁺	Hidróxido/ protón
HA	Hemaglutinina
ICP	Espectrofotómetro de iones acoplado a plasma
IL	Dominio ' <i>Internal loop</i> '
JA	Ácido jasmónico (del inglés, ' <i>jasmonic acid</i> ')
kDa	Kilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LB	Medio Luria-Broth
LiCl	Cloruro de litio
MAPK	' <i>Mitogen activated protein kinase</i> '
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

Anexos

mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
mV	Milivoltios
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
ng	Nanogramo
NH₄⁺	Ion amonio
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
NO₃⁻	Ion nitrato
NSCC	Canal de cationes no selectivo
N-t	Dominio N-terminal
∅	Diámetro
PA	Medio Arginina-Fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PF	Peso freco
PLATE	Solución de transformación de levaduras (<u>P</u> EG/ <u>L</u> ithium <u>A</u> cetate/ <u>T</u> ris/ <u>E</u> DTA)
PS	Peso seco
PSA	Persulfato amónico
RBOH	<i>Respiratory Burst Oxidase Homolog'</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés, ' <i>Reactive Oxygen Species</i> ')
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis de poli(acrilamida) con SDS
SEK	Potasio de baja disponibilidad (del inglés, ' <i>Slowly Exchangeable K</i> ')
SN	Solución nutritiva
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
Taq	ADN polimerasa, aislada de <i>Thermus aquaticus</i>
TEA	Tetraetilamonio
TEMED	Tetrametiletilendiamina
T_m	Temperatura de ' <i>melting</i> '
U	Unidad
UV	Ultravioleta
v	Volumen
V_m	Velocidad máxima
Y2H	Ensayo de doble híbrido en levadura (del inglés, ' <i>Yeast Two Hybrid</i> ')
YFP	Proteína amarilla fluorescente (del inglés, ' <i>Yellow Fluorescent Protein</i> ')
YPD	Medio para crecimiento de levaduras (del inglés, ' <i>Yeast Peptone Dextrose</i> ')
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromolar

Código de Aminoácidos

A	Ala	Alanina
I	Ile	Isoleucina
L	leu	Leucina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
W	Trp	Triptófano
V	Val	Valina
R	Arg	Arginina
H	His	Histidina
K	Lys	Lisina
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
N	Asn	Asparagina
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
G	Gly	Glicina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
Y	Tyr	Tirosina

Apolares
Polares básicos (+)
Polares ácidos (-)
Polares neutros

ANEXO 2. CEBADORES DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Reacción	Nombre	Secuencia de 5' a 3'	Descripción
RT-qPCR	qAtACT2-F	CGGTGGTTCCATTC- TTGCTT	Amplificación del gen de <i>Actina2</i> de <i>A. thaliana</i>
	qAtACT2-R	CGGCCTTGGAGATCCACAT	
	qSIEF1 α -F	GGCGGTGGCGAGCAT	Amplificación del gen <i>Factor de Elongación-1α</i> de <i>S. lycopersicum</i>
	qSIEF1 α -R	AAACCAAGGCACCTCAACA AA	
	qAtHAK5-F	AAGAGGAACCAAATGCTGA GACA	Amplificación del gen <i>AtHAK5</i> de <i>A. thaliana</i>
	qAtHAK5-R	GCCCCGATGAAGGGACAT	
	qSIHAK5-F	CCGTGTTACGCGCCTTTAA	Amplificación del gen <i>SIHAK5</i> de <i>S. lycopersicum</i>
	qSIHAK5-R	TCCTTTTTTACCGTTTCTTTG AAG	
	qAKT1-F	TGTCACTCTTTTTGCGGTTC A	Amplificación del gen de <i>AKT1</i> de <i>A. thaliana</i>
	qAKT1-R	TTGCGCGCTGCGATAA	
	qLKT1-F	TGCCTGCTCGACTCCAAGA	Amplificación del gen <i>LKT1</i> de <i>S. lycopersicum</i>
	qLKT1-R	TCCGAGTCTGTTCTGAACTT CAAG	
	qAtSKOR-F	CATCCTGGTGATTCGAAAG AGAA	Amplificación del gen <i>AtSKOR</i> de <i>A. thaliana</i>
	qAtSKOR-R	GATGCTTCGAGGTACCCAC AGT	
	qSISKOR-F	CTATAAGGCTGTTGGCAGC AAA	Amplificación del gen <i>SISKOR</i> de <i>S. lycopersicum</i>
	qSISKOR-R	TGCCCTGCTCAACCGAAT	
PCR	ppDR195-F	CCTATCATTATCGTCTAACA TC	Amplificación del plásmido pDR195
	ppDR195-R	GGCGAAGAAGTCCAAAGCT GG	
	AtHAK5-Ct-F	ATCTCTCGTGA ^{AAATGCTAT}	Amplificación del dominio C-terminal (C-t) de <i>AtHAK5</i>
	AtHAK5-Ct+STOP-R	CCCTTATAACTCATAGGTCA TGCCAA	
	AtHAK5-IL-F	GATAACGGTGAAGGAGGA ACAT	Amplificación del dominio ' <i>Internal Loop</i> ' (IL) de <i>AtHAK5</i>
	AtHAK5-IL+STOP-R	TTAGAATTTAGAGTTCTCGA	
Muta- génesis dirigida	pHA1-AtHAK5-F	GTCCCCGACTACGCCGAGG AACATCAAATAGATGGTGA TGAAG	Reacción de PCR1 para la inserción del epítipo HA en <i>AtHAK5</i>
	pHA1-AtHAK5-R	GGCGTAGTCGGGGACACC ATCCATGCGGCCGCTCGA	
	pHA2-AtHAK5-F	GATGGTTACCCTACGACG TCCCCGACTACGCCGAGGA AC	Reacción de PCR2 para la inserción del epítipo HA en <i>AtHAK5</i>
	pHA2-AtHAK5-R	GTCGTAGGGGTAACCATCC ATGCGGCCGCTCGAG	

pNotI-ATG-F	CCC GCGGCCGCATGGATGG TGAGGAACATC	Amplificación de <i>AtHAK5</i> desde el codón de iniciación e inserción de la secuencia de restricción de <i>NotI</i>
p539+BglII-F	GGGAGAAGATCTCTCGTGA AAATGC	Amplificación de <i>AtHAK5</i> desde el aminoácido 539 e introducir la secuencia de restricción <i>BglII</i>
p539+STOP+SpeI-R	GGGACTAGTTTAGATCTTCT CCCTCAGCTCGTACCGG	Inserción de un codón STOP y de la secuencia de restricción de <i>SpeI</i> en el aminoácido 539 de <i>AtHAK5</i>
p555+STOP+SpeI-R	GGGACTAGTTTAAACCCGG TTACGTCAGGACT	Inserción de un codón STOP y de la secuencia de restricción de <i>SpeI</i> en el aminoácido 555 de <i>AtHAK5</i>
p571+STOP+SpeI-R	GGGACTAGTTTAAAGTTATA CCGTTAACAAGCTCCG	Inserción de un codón STOP y de la secuencia de restricción de <i>SpeI</i> en el aminoácido 571 de <i>AtHAK5</i>
p633+STOP+SpeI-R	GGGACTAGTTTACTCAATG TCTTCTTGTAAAC	Inserción de un codón STOP y de la secuencia de restricción de <i>SpeI</i> en el aminoácido 633 de <i>AtHAK5</i>
p688+STOP+SpeI-R	GGGACTAGTTTACGATGAA GGGACATAATTAGACG	Inserción de un codon STOP y de la secuencia de restricción de <i>SpeI</i> en el aminoácido 688 de <i>AtHAK5</i>
p744+STOP+SpeI-R	GGGACTAGTTTAAAGAAGAC TCTTCTCTGCCG	Inserción de un codón STOP y de la secuencia de restricción de <i>SpeI</i> en el aminoácido 744 de <i>AtHAK5</i>
p572-625-F	GCTTGTTAACGGTATAACTT ATGGTTACAAGGAAGACAT TGAGGAGC	Delección de la secuencia comprendida entre los aminoácidos 572 y 625 de <i>AtHAK5</i>
p572-625-R	GTCTTCCTTGTAACCATAAG TTATACCGTTAACAAGCTCC GTG	
pG67A-F	CCTAGCTGTGGTGTATGGA GATATC	Sustitución de glicina por alanina en la posición 67 de <i>AtHAK5</i>
pG67A-R	GATATCTCCATACACCACA GCTAGG	
pY70A-F	GTGGTGGCTGGAGATATCG GG	Sustitución de tirosina por alanina en la posición 70 de <i>AtHAK5</i>
pY70A-R	CCCGATATCTCCAGCCACCA C	
pG71A-F	GTGGTGTATGCCGATATCG GG	Sustitución de glicina por alanina en la posición 71 de <i>AtHAK5</i>
pG71A-R	CCCGATATCGGCATACACC AC	
pD72A-F	GAGTGGTGTATGGAGCTAT CGGGACATCGCC	Sustitución de ácido aspártico por alanina en la posición 72 de <i>AtHAK5</i>
pD72A-R	GGCGATGTCCCGATAGCTC CATACACCACTC	
pG74A-F	TATGGAGATATCGCTACAT CGCC	Sustitución de glicina por alanina en la posición 74 de <i>AtHAK5</i>
pG74A-R	GGCGATGTAGCGATATCTC CATA	
pS76A-F	GGTGTATGGAGATATCGGG ACAGCGCCATTATATG	Sustitución de serina por alanina en la posición 76 de <i>AtHAK5</i>
pS76A-R	CATATAATGGCGCTGTCCC GATATCTCCATACACC	
pP77A-F	GAGATATCGGGACATCGGC ATTATATGTGTATGC	Sustitución de prolina por alanina en la posición 77 de <i>AtHAK5</i>

Anexos

	pP77A-R	GCATACACATATAATGCCG ATGTCCCGATATCTC	
	pD201A-R	GAAGGAGTAAGGATTCCA GCACCAATGACCATGGAAG	Sustitución de ácido aspártico por alanina en la posición 201 de AtHAK5
	pD201A-F	CTCCATGGTCATTGGTGCT GGAATCCTTACTCCTTC	
	pE312A-R	TCAGCAAACATTGCCGCCG TCCCAATGATGC	Sustitución de ácido glutámico por alanina en la posición 312 de AtHAK5
	pE312A-F	GCATCACTGGGACGGCGGC AATGTTTGCTGA	
Identificación de T-ADN	Lb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCA AC	Identificación de la inserción de T-ADN (extremo izquierdo)
	LP630604	TTGTAACACTTGGAACAGA GTCCCA	Identificación de la inserción de T-ADN en el gen AthAK5
	RP630604	AGCTTTTTGTCACTTTGATT CTT	
	LP571397	CATTTATGAGGATCGGAAA CAAG	Identificación de la inserción de T-ADN en el gen AKT1
	RP571398	GGCTTTCTCAAGAACCCAA AC	
	CIPK23FtDNA	GTTATGGAACATATTTGTG GTCC	Identificación de la inserción de T-ADN en el gen AtCIPK23
	CIPK23RtDNA	AGCCTTCAGATCTACTCAAT CC	

ANEXO 3. PLÁSMIDOS.

Vector	Organismo	Referencia
pDR195	Bacteria/levadura	(Rentsch, D. y col., 1995)
pYPGE15	Bacteria/levadura	(Brunellii, J.P. y Pall, M.L., 1993)
p425GPD	Bacteria/levadura	(Mumberg, D. y col., 1995)
p414GPD	Bacteria/levadura	(Mumberg, D. y col., 1995)
pRS425	Bacteria/levadura	(Christianson, T.W. y col., 1992)
AtHAK5 pDR195	Bacteria/levadura	(Rubio, F. y col., 2010)
AtHAK5 pRS425	Bacteria/levadura	Esta Tesis (IBVF)
EsHAK5 pDR195	Bacteria/levadura	(Alemán, F. y col., 2009a)
SIHAK5 pDR195	Bacteria/levadura	(Nieves-Cordones, M. y col., 2007)
CaHAK5 pDR195	Bacteria/levadura	(Martínez-Cordero, M.A. y col., 2004)
SIHAK5q pDR195	Bacteria/levadura	(Nieves-Cordones, M. y col., 2007)
AtCIPK23 p414GPD	Bacteria/levadura	Esta Tesis (IBVF)
AtCIPK23 (K60N) p414GPD	Bacteria/levadura	Esta Tesis (IBVF)
CIPK23 (T190D, Δ331) p414GPD	Bacteria/levadura	Esta Tesis (IBVF)
AtCBL1-AtCBL3 pYPGE15	Bacteria/levadura	Esta Tesis (IBVF)
AtCBL5-AtCBL9 pYPGE15	Bacteria/levadura	Esta Tesis (IBVF)
AtCBL4 pYPGE15	Bacteria/levadura	(Guo, Y. y col., 2004)
AtCBL10 pYPGE15	Bacteria/levadura	(Quan, R. y col., 2007)
AtCIPK23/AtCBL1 p414GPD	Bacteria/levadura	Esta Tesis (IBVF)
AtCIPK1-AtCIPK26 P414GPD	Bacteria/levadura	Esta Tesis (IBVF)
AtHAK5Δ539 pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5Δ555 pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5Δ571 pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5Δ633 pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5Δ688 pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5Δ744 pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5Δ572-625 pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5 (S35A) pDR195	Bacteria/levadura	Dr. Quintero (IBVF)
AtHAK5 (S35A, Δ571) pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5 (F130S) pDR196	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5 (G71A) pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5 (D72A) pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5 (G74A) pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5 (S76A) pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5 (P77A) pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis

Anexos

AtHAK5 (D201A) pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
AtHAK5 (E312A) pDR195	Bacteria/levadura	Esta Tesis
P19 pBin61	Planta/ bacteria	(Waadt, R. y col., 2014)
pSPYNE173	Planta/ bacteria	(Waadt, R. y col., 2008)
pSPYCE (M)	Planta/ bacteria	(Waadt, R. y col., 2008)
SOS1 pSPYNE173	Planta/ bacteria	(Núñez-Ramírez, R. y col., 2012)
SOS1 pSPYCE (M)	Planta/ bacteria	Dr. Quintero (IBVF)
AtHAK5 pSPYNE173	Planta/ bacteria	Dr. Quintero (IBVF)
AtHAK5 pSPYCE (M)	Planta/ bacteria	Esta Tesis
pDEST™ 22	Levadura	Invitrogen
pDEST™ 32	Levadura	Invitrogen
AtHAK5-Ct::AD	Levadura	Esta Tesis
AtHAK5-Ct::BD	Levadura	Esta Tesis
AtHAK5-IL::AD	Levadura	Esta Tesis
AtHAK5-IL::BD	Levadura	Esta Tesis
AtCIPK23::AD	Levadura	Dr. Quintero (IBVF)
AtCBL1::BD	Levadura	Dr. Quintero (IBVF)

ANEXO 4. OBTENCIÓN DE LÍNEAS MUTANTES HOMOCIGOTAS DE *A. THALIANA*.

Previamente a la realización de esta Tesis Doctoral se disponía en el laboratorio del Dr. Rubio de las líneas de inserción de T-ADN en AtHAK5 (Salk_130604), AKT1 (Salk_017803) y AtCIPK23 (Salk_138057), obtenidas del Centro ABRC (*'Arabidopsis Biological Resource Center'*).

Anexo 4.1. Obtención del doble mutante *hak5-3 cipk23-5*.

Para obtener la línea doble mutante *hak5-3 cipk23-5* se realizó el cruzamiento entre la línea mutante homocigota *athak5-3* como parental femenino (f) y la línea mutante homocigótica *atcipk23-5* como parental masculino (m), como se describe en MyM apartado 2.1.1.1.

Las semillas obtenidas se esterilizaron y se germinaron en medio de cultivo hidropónico (MyM apartado 1.3.1.1), y transcurridos 15 días se extrajo el ADN genómico de una hoja (MyM apartado 2.2.1.2) para comprobar la presencia de T-ADN mediante PCR (MyM apartado 2.2.1.4). Para ello, se utilizó un cebador que alinea en una región del gen *AtHAK5* adyacente del sitio de inserción, al que se denominó (P630604) y el cebador LBb1, que alinea el extremo izquierdo del T-ADN. Para comprobar la inserción en el gen *AtCIPK23*, se utilizó un cebador que alinea en la región de *AtCIPK23* adyacente al sitio de inserción, denominado AtCIPK23RtDNA; y el cebador LBb1, que alinea el extremo izquierdo del T-ADN (cebadores recogidos en el Anexo 2).

Se partió del número suficiente de plantas candidatas para la obtención de al menos, un mutante *hak5-3 cipk23-5*.

Anexo 4.2. Obtención del doble mutante *akt1-2 cipk23-5*.

Para obtener la línea doble mutante *akt1-2 cipk23-5* se realizó el cruzamiento entre la línea mutante homocigota *akt1-2* como parental femenino (f) y la línea mutante homocigótica *atcipk23-5* como parental masculino (m), como se describe en MyM, apartado 2.1.1.1.

De igual forma, las semillas obtenidas se esterilizaron y germinaron en medio de cultivo hidropónico (MyM apartado 1.3.1.1), y transcurridos 15 días se extrajo el ADN genómico (MyM apartado 2.2.1.2) para comprobar la presencia de T-ADN mediante PCR (MyM apartado 2.2.1.4). Se utilizó un cebador que alinea en la región de *AKT1* adyacente del sitio de inserción, al que se denominó (LP571397); y el cebador LBb1, que alinea el extremo izquierdo del T-ADN. La comprobación de la inserción en *AtCIPK23* se realizó con los mismos cebadores descritos en el apartado anterior, para el doble mutante *hak5-3 cipk23-5* (cebadores recogidos en el Anexo 2).

Se partió del número suficiente de plantas candidatas para la obtención de al menos, un mutante *akt1-2 cipk23-5*.

Anexo 4.3. Obtención del triple mutante *hak5-3 akt1-2 cipk23-5*.

Para obtener la línea triple mutante *hak5-3 akt1-2 cipk23-5* se realizó el cruzamiento entre la línea doble mutante homocigota *akt1-2 cipk23-5* como parental femenino (f) y la línea doble mutante homocigótica *hak5-3 akt1-2* como parental masculino (m), como se describe en MyM apartado 2.1.1.1.

De igual forma, las semillas obtenidas se esterilizaron y germinaron en medio de cultivo hidropónico (MyM apartado 1.3.1.1), y transcurridos 15 días se extrajo el ADN genómico (MyM apartado 2.2.1.2) para comprobar la presencia de T-ADN mediante PCR (MyM apartado 2.2.1.4). Para comprobar la inserción en los genes *AtHAK5*, *AKT1* y *AtCIPK23*, se utilizaron los cebadores descritos en los apartados anteriores.

Se partió del número suficiente de plantas candidatas para la obtención de al menos, un mutante *hak5-3 akt1-2 cipk23-5*.

ANEXO 5. INSERCIÓN DEL EPÍTOPO DE LA HEMAGLUTININA EN AtHAK5.

La inserción del epítipo de la Hemaglutinina (HA) en la secuencia de AtHAK5 se llevó a cabo en la misma localización del ADNc que en el transportador HAK1 de *Neurospora crassa* (Rivetta, A. y col., 2013), puesto que en este estudio no se vio afectado el funcionamiento de NcHAK1 por la presencia de dicho epítipo.

La estrategia de mutagénesis dirigida por PCR consistió en la realización de dos reacciones de PCR, seguidas de una PCR de unión de los fragmentos flanqueantes sobre la secuencia de AtHAK5 en el plásmido pDR195 (Figura 107). Las reacciones de PCR de inserción se realizaron con cebadores que contenían parte de la secuencia del epítipo de la HA y la reacción de PCR de unión se llevó a cabo con cebadores que amplifican el plásmido pDR195. Las secuencias de los cebadores se encuentran recogidas en el Anexo 2.

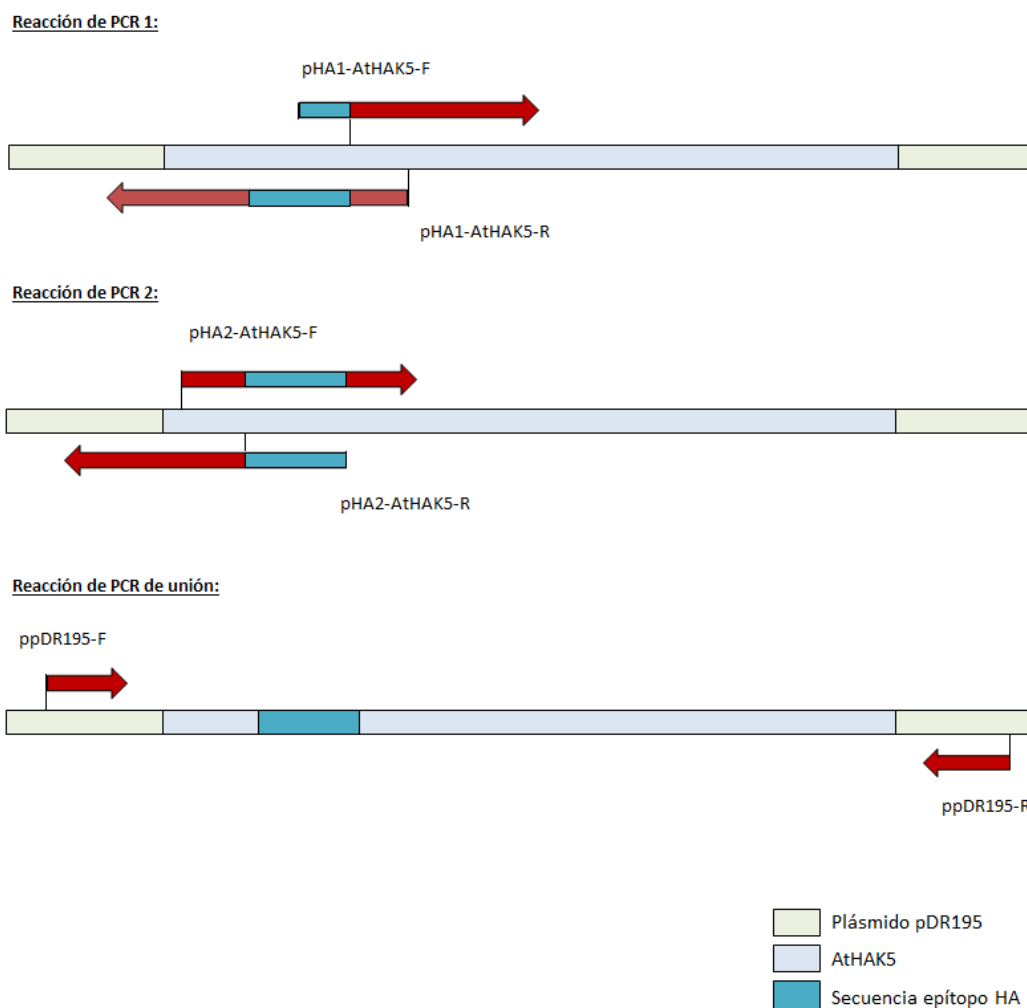


Figura 107. Esquema de la estrategia seguida para la inserción del epítipo de la HA en la secuencia de AtHAK5, mediante mutagénesis dirigida por PCR.

ANEXO 6. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE AtHAK5 CON DELECIONES EN SU DOMINIO C-TERMINAL.

La estrategia molecular para llevar a cabo las deleciones del dominio C-terminal de la proteína AtHAK5 comprendió varios pasos, detallados a continuación.

El primer paso (Figura 108) consistió en la amplificación mediante PCR convencional de las secuencias nucleotídicas que incluían las distintas deleciones. En el caso de la deleción de todo el dominio C-terminal (AtHAK5 Δ 539), el fragmento amplificado abarcaba desde el principio de la secuencia de AtHAK5 hasta el aminoácido 539; mientras que, en el resto de construcciones, el fragmento amplificado abarcaba desde el aminoácido 540 hasta el último aminoácido que constituía cada deleción. Para llevar a cabo la PCR de la deleción Δ 539, el cebador en dirección 5'-3' se diseñó introduciendo la secuencia nucleotídica del sitio de restricción de la enzima *NotI* al inicio de la secuencia de AtHAK5; y el cebador que amplifica en dirección 3'-5' se diseñó con la secuencia nucleotídica del aminoácido en posición 539, seguida de la secuencia de un codón STOP para llevar a cabo el final de la síntesis de la proteína en este aminoácido, seguida a su vez de la secuencia del sitio de restricción de la enzima *SpeI*. Para la amplificación de las secuencias del resto de deleciones, el cebador en dirección 5'-3' se diseñó introduciendo la secuencia nucleotídica para del sitio de restricción de la enzima *BglII* tras el aminoácido 539 de AtHAK5; y el cebador que amplifica en dirección 3'-5' se diseñó con la secuencia nucleotídica de las distintas deleciones, seguida de la secuencia de un codón STOP, seguida a su vez de la secuencia del sitio de restricción de la enzima *SpeI*. Los cebadores diseñados se recogen en el Anexo 2.

Paso 1: Amplificación, mediante PCR, de los fragmentos de AtHAK5 para realizar las distintas deleciones del dominio C-terminal.

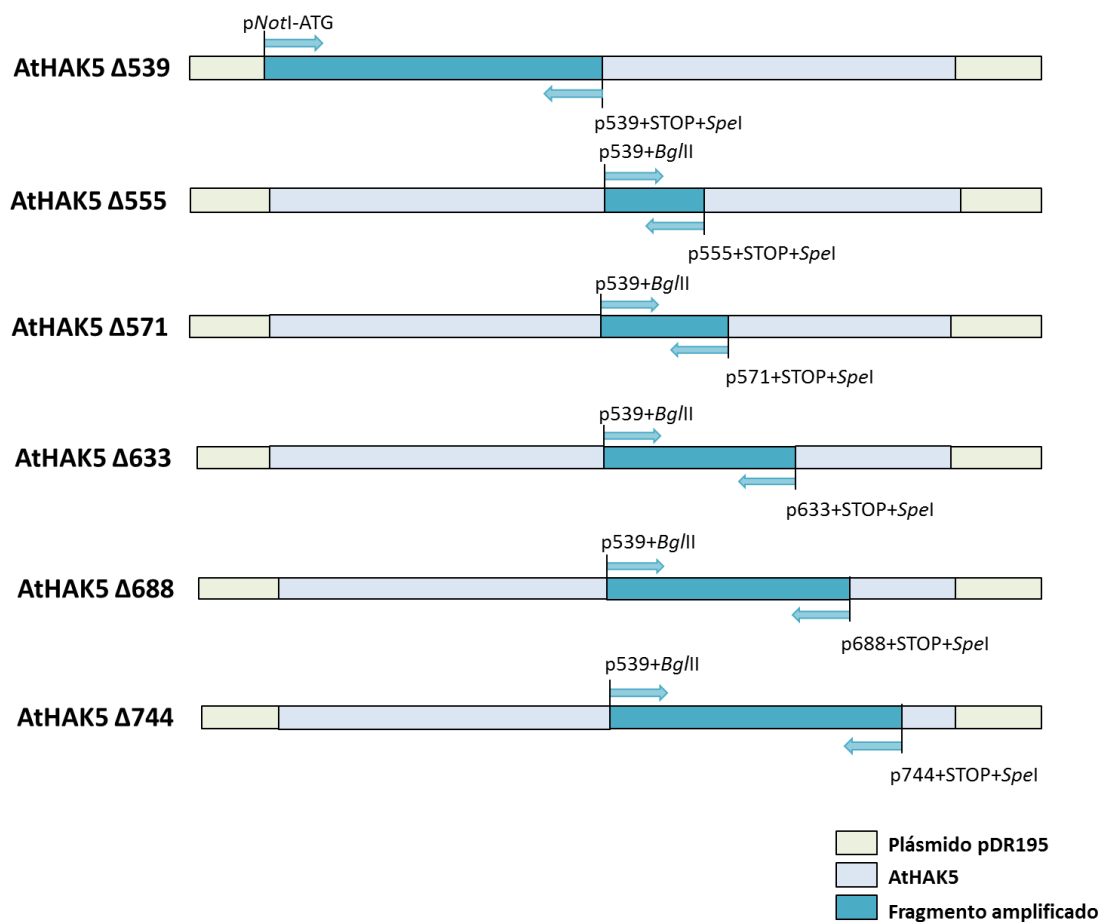


Figura 108. Amplificación mediante PCR convencional, de los fragmentos de AtHAK5 para llevar a cabo las distintas deleciones de su extremo C-terminal.

Una vez amplificadas las secuencias de interés, se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO® y se comprobó mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* que los productos de PCR tenían el tamaño adecuado. Las secuencias de los candidatos se comprobaron también mediante secuenciación para descartar mutaciones al azar producidas sobre las secuencias amplificadas por PCR.

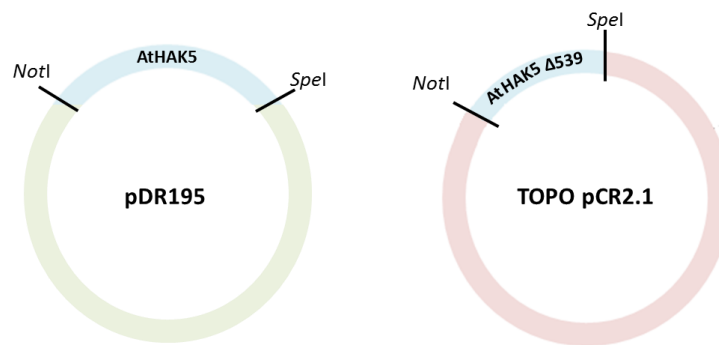
A continuación, se llevó a cabo la digestión del ADNc de AtHAK5 silvestre (clonada en el plásmido pDR195) y del ADNc de AtHAK5Δ539 (en el vector pCR2.1-TOPO®) con las enzimas de restricción *NotI* y *SpeI*, seguida de la purificación de las bandas del gel de electroforesis de los fragmentos del tamaño deseado para cada uno (el fragmento de 6,3 Kb de AtHAK5 silvestre; y de 1,6 Kb de AtHAK5Δ539). Una vez purificados los fragmentos, se procedió a su ligamiento,

Anexos

obteniéndose la secuencia de AtHAK5 con el dominio C-terminal deletado (AtHAK5Δ539) en el plásmido pDR195 (Figura 109).

Paso 2: Clonación de los productos de PCR en TOPO pCR2.1 y comprobación de candidatos.

Paso 3: Digestión enzimática con *NotI* y *SpeI* de AtHAK5 silvestre en pDR195 y del clon AtHAK5Δ539 en TOPO pCR2.1.



Paso 4: Purificación de los fragmentos de interés y posterior ligamiento de ambos.

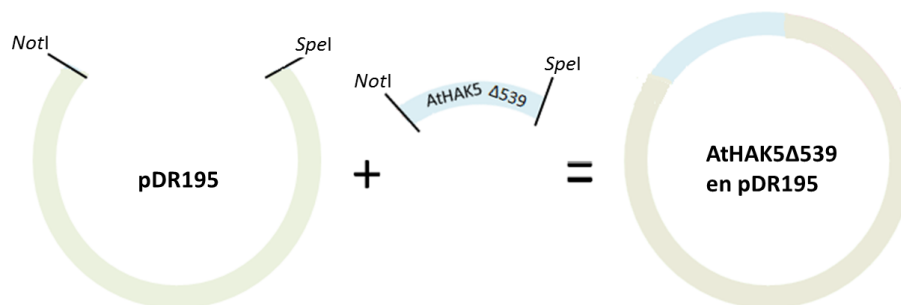
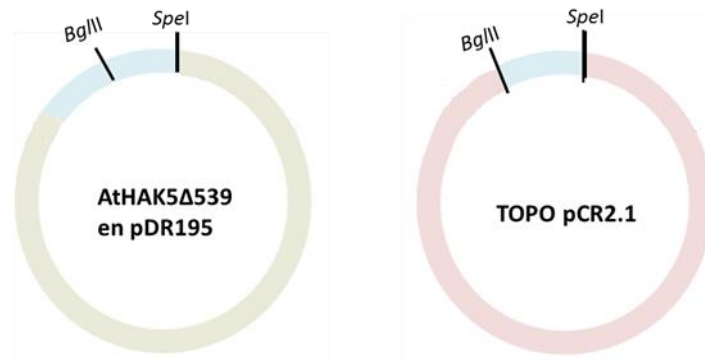


Figura 109. Digestión enzimática y posterior ligamiento de los fragmentos de interés, para obtener la construcción AtHAK5Δ539. Una vez clonados los productos de PCR en TOPO pCR2.1 (Paso 2), se llevó a cabo la digestión enzimática con *NotI* y *SpeI* de la secuencia de AtHAK5 en el plásmido pDR195 y del clon AtHAK5Δ539 en TOPO pCR2.1 (Paso 3), para su posterior purificación y ligamiento del fragmento de pDR195 sin la secuencia de AtHAK5 WT y el fragmento de AtHAK5Δ539 (Paso 4), obteniéndose la deleción AtHAK5Δ539 en el plásmido pDR195.

El resto de deleciones se obtuvieron mediante la digestión de las secuencias en pCR2.1-TOPO® con las enzimas de restricción *BglII* y *SpeI* (Paso 5) y el posterior ligamiento (Paso 6) con el fragmento purificado de AtHAK5 Δ539 (Figura 110).

Paso 5: Digestión enzimática con *Bgl*II y *Spe*I de AtHAK5Δ539 en pDR195 y de los clones del resto de deleciones en TOPO pCR2.1.



Paso 6: Purificación de los fragmentos de interés y posterior ligamiento de ambos.

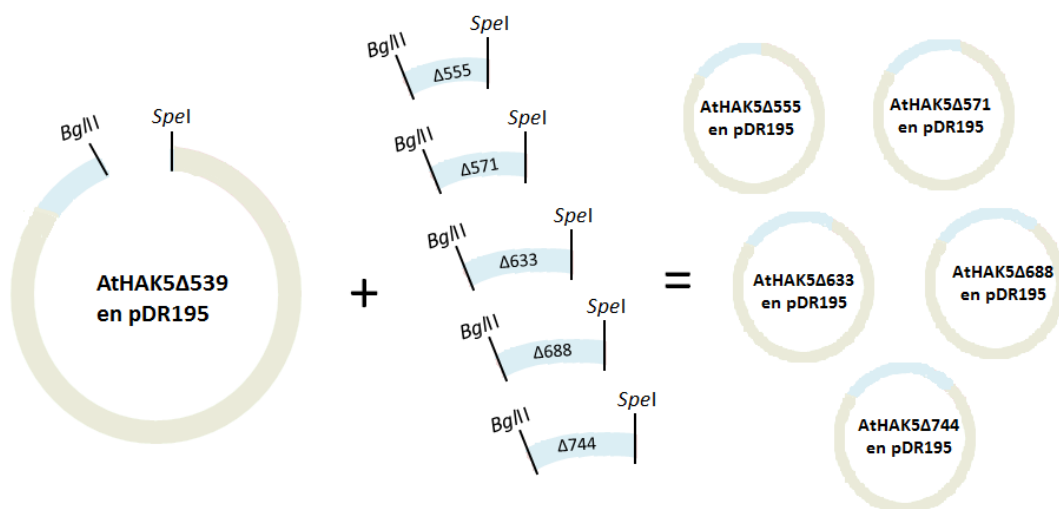


Figura 110. Digestión enzimática y posterior ligamiento de los fragmentos de interés, para obtener las distintas construcciones de AtHAK5 con deleciones en su extremo C-terminal. El paso 5 consistió en la digestión de la construcción AtHAK5Δ539 en pDR195, y de los fragmentos de PCR del resto de deleciones en TOPO, para su posterior purificación y ligamiento (Paso 6), obteniéndose el resto de construcciones: AtHAK5Δ555, AtHAK5Δ571, AtHAK5Δ633, AtHAK5Δ688 y AtHAK5Δ744, en el plásmido pDR195.

En la Figura 111 se muestra la digestión *Not*I-*Bgl*II de las construcciones realizadas para comprobar el tamaño correcto de las deleciones del dominio C-terminal de AtHAK5.

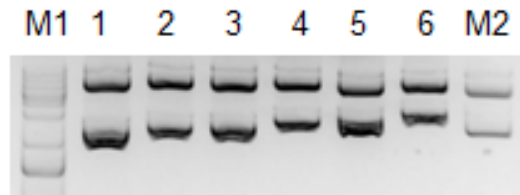
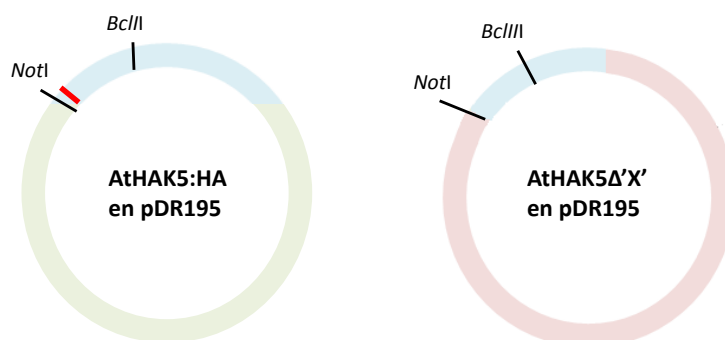


Figura 111. Electroforesis de la digestión enzimática con *NotI* y *BglII* de las construcciones de AtHAK5 en pDR195 con las distintas deleciones en el dominio C-terminal, para comprobar los tamaños de las deleciones. Calle 1: AtHAK5 Δ 539; Calle 2: AtHAK5 Δ 571; Calle 3: AtHAK5 Δ 633; Calle 4: AtHAK5 Δ 688; Calle 5: AtHAK5 Δ 744; Calle 6: AtHAK5 silvestre. M1= marcados de peso molecular DNA Molecular Weight Marker VI (Roche); M2= marcador de peso molecular Lambda DNA /HindIII (Roche).

Anexo 6.1. Inserción del epítipo de la HA en las construcciones de AtHAK5 con deleciones en su dominio terminal.

Para la inserción del epítipo de la HA en las construcciones de AtHAK5 con deleciones en el dominio C-terminal, se digirió el ADNc de AtHAK5 WT con el epítipo HA (Anexo 5), con las enzimas de restricción *NotI*-*BclII*, y también los ADNcs de las construcciones con las deleciones en el plásmido pDR195. Posteriormente, se purificaron los fragmentos de interés y se ligaron mediante la utilización de la T4 ADN Ligasa (Figura 112).

Paso 1: Digestión enzimática con *NotI* y *BclII* de AtHAK5 silvestre con HA en pDR195 y de las distintas construcciones de AtHAK5 con las deleciones en pDR195.



Paso 2: Purificación de los fragmentos de interés y posterior ligamiento de ambos.

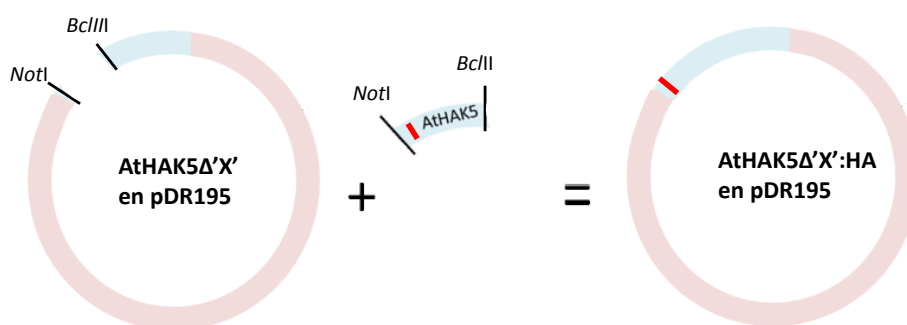


Figura 112. Digestión enzimática y posterior ligamiento de los fragmentos de interés, para obtener las distintas construcciones de AtHAK5 con deleciones en su extremo C-terminal con el epítopo de la HA. El paso 1 consistió en la digestión de la construcción AtHAK5:HA en pDR195, y de las distintas deleciones en pDR195 para su posterior purificación y ligamiento (Paso 2), obteniéndose el resto de construcciones: AtHAK5Δ555, AtHAK5Δ571, AtHAK5Δ633, AtHAK5Δ688 y AtHAK5Δ744, en el plásmido pDR195, con el epítopo de la hemaglutinina (en rojo), insertado. La letra 'X', hace referencia a las deleciones de AtHAK5: 539, 555, 571, 633, 688, y 744.

Anexo 6.2. Construcción AtHAK5 S35A, Δ571.

La construcción construcción AtHAK5 S35A, Δ571 se generó llevando a cabo la digestión enzimática del mutante AtHAK5 S35A (cedido amablemente por el Dr. Quintero, del centro IBVF-CSIC), con las enzimas de restricción *NotI*-*BclII*, y también la construcción AtHAK5Δ571 en el plásmido pDR195. Posteriormente, se purificaron los fragmentos de interés y se ligaron mediante la utilización de la T4 ADN Ligasa, estrategia similar a la ilustrada en la Figura 112, pero con la utilización de plásmidos diferentes.

Anexo 6.3. Generación de la deleción interna Δ 572-625 en el dominio C-terminal de AtHAK5.

Para obtener la construcción de AtHAK5 con la deleción interna Δ 572-625 en su dominio C-terminal se siguió la estrategia ilustrada en la Figura 113.

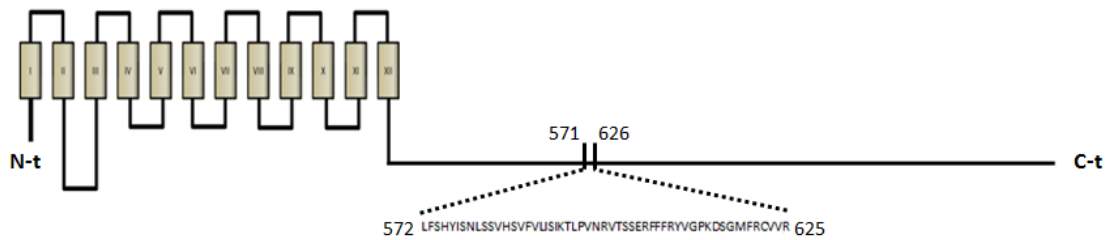


Figura 113. Ilustración de la deleción interna del dominio C-terminal de AtHAK5, desde el aminoácido en posición 572 hasta el aminoácido 625, ambos incluidos.

El primer paso (Figura 114, Paso 1) consistió en la realización de una PCR dirigida sobre el ADNc de AtHAK5 clonado en el plásmido pDR195, con la utilización de cebadores (recogidos en el Anexo 2) diseñados con “QuickChange Primer Design” (<https://genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>) para eliminar el fragmento de interés. A continuación (Figura 114, Paso 2), se añadió la enzima de restricción *dpnI* para eliminar los fragmentos metilados y hemimetilados obtenidos, quedando únicamente los productos de PCR correspondientes al plásmido mutado. El producto de PCR se transformó mediante electroporación en la cepa Top10 de *E. coli* y se incubaron las células con el antibiótico de selección (ampicilina para el plásmido pDR195) (Figura 114, Paso 3). Mediante PCR convencional y secuenciación, se comprobó que los clones obtenidos presentasen la deleción de interés en la secuencia de AtHAK5.

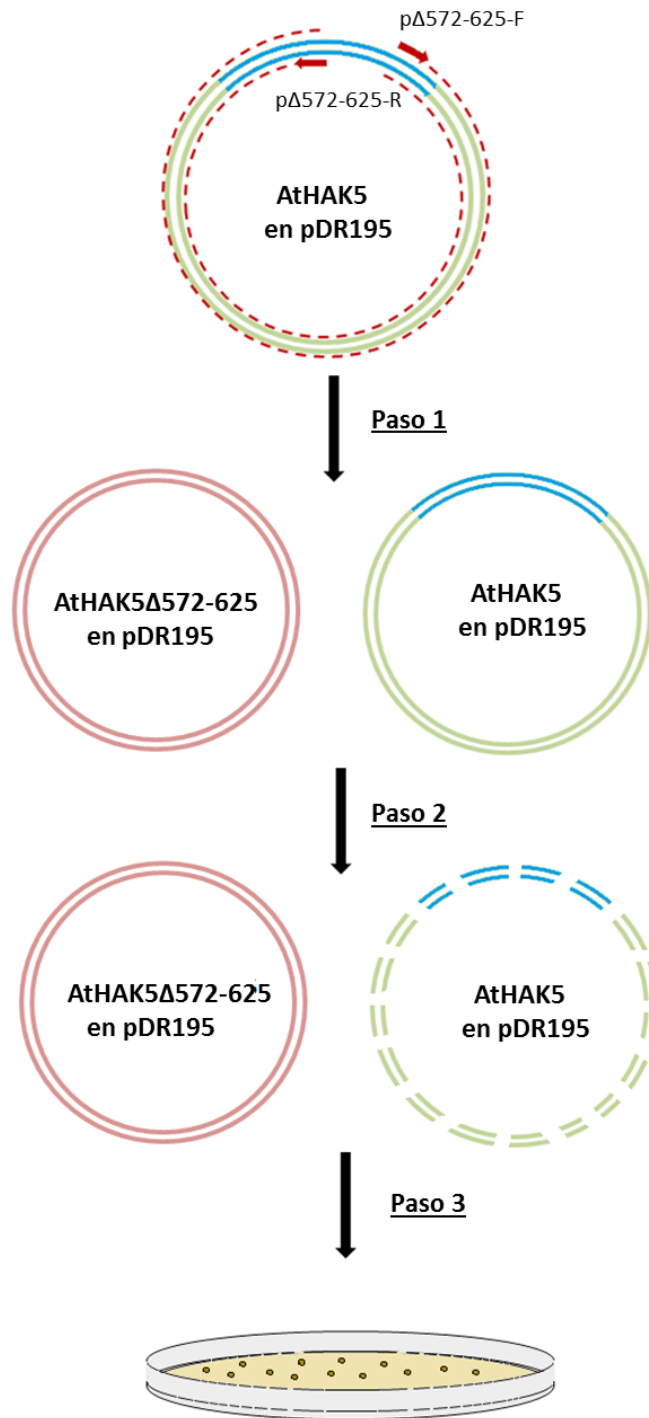


Figura 114. Esquema de procedimiento del método 'Quick Change' de mutagénesis dirigida por PCR, para llevar a cabo la deleción desde el aminoácido 572 al 625, de AtHAK5.

ANEXO 7. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA EL ENSAYO DE Y2H.

Para la generación de las construcciones utilizadas en los ensayos de doble híbrido en levadura, fue necesario la utilización de los reactivos y kits siguientes: ProQuest™ Two-Hybrid System (Cat. PQ10001-01, Invitrogen); pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Cat. K2500-20, Invitrogen) y Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix (Cat. 11791-020, Invitrogen). Los pasos llevados a cabo para la obtención de las construcciones, se recogen en las Figuras 115 y 116.

El primer paso consistió en la amplificación de los fragmentos de ADN de interés (Figura 115, Paso 1) mediante PCR convencional con la ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (Thermo Fischer Scientific) (reactivos y condiciones recogidos en las Tablas 55 y 56). Se diseñaron los cebadores adecuados (recogidos en el Anexo 2) para amplificar los dominios C-terminal (desde el aminoácido 539 hasta el 785); N-terminal (desde el aminoácido 1 al 95) e IL (desde el aminoácido 123 al 182). En los cebadores dirección 3'-5', se incluyó la secuencia nucleotídica para introducir un codón de STOP al final de cada fragmento, con el fin de asegurar el fin de la traducción

Tabla 55. Reactivos utilizados en la PCR para amplificar los fragmentos de interés.

ADN	10 ng
Tampón 5X HF*	5 µL
dNTPs (50 mM)	0,5 µL
Cebadores (10 µM)	5 µL
Polimerasa <i>Phusion</i> (2U/µL)**	0,5 µL
Agua destilada	Hasta 50 µL
Volumen Final	50 µL

* 5X *Phusion* HF Buffer (Cat. F530S, Thermo Fisher Scientific).

***Phusion* High-Fidelity DNA polymerase (Cat. F530S, Thermo Fisher Scientific).

Tabla 56. Condiciones del termociclador utilizadas para amplificar los fragmentos de interés.

	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial:	94 °C	2'	} x 25
Desnaturalización inicial:	94 °C	1'	
Alineamiento:	65 °C / 50 °C *	1'	
Extensión:	72 °C	1'	
Extensión final:	72 °C	7'	

*65 °C para la amplificación de los fragmentos C-t y N-t; y de 50 °C para la amplificación del fragmento IL.

Tabla 57. Reactivos utilizados para la reacción de clonación en pCR™8/GW/TOPO®.

Producto de PCR	2 µL
'Salt solution' (¼)	1 µL
Agua destilada	2 µL
Vector TOPO®	1 µL
Volumen Final	6 µL

Paso 1: Amplificación, mediante PCR, de los fragmentos de interés de AtHAK5.

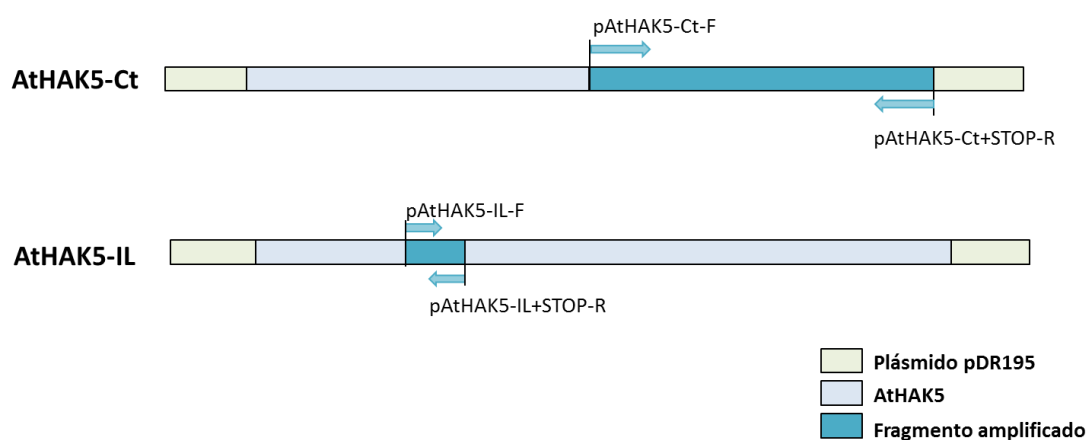
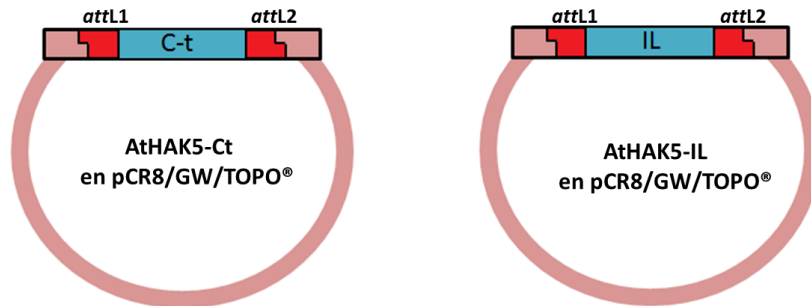


Figura 115. Esquema de la estrategia seguida para la generación de construcciones para el ensayo de doble híbrido en levadura. El paso 1 consistió en la amplificación mediante PCR convencional, de los fragmentos de AtHAK5 a ensayar (dominio C-terminal, Ct; e 'Internal Loop', IL).

Una vez amplificados los fragmentos, se clonaron mediante tecnología GATEWAY en el vector pCR™8/GW/TOPO® siguiendo las instrucciones del fabricante (condiciones recogidas en la Tabla 57) obteniéndose los denominados 'clones de entrada' (Figura 116, Paso 2). A continuación, cada uno de los 'clones de entrada' obtenidos se recombinaron con los vectores pDEST™22 y pDEST™32, obteniéndose los clones de expresión 'cebo' y 'presa', respectivamente (Figura 116, Paso 3). Las condiciones utilizadas para la reacción de recombinación mediante la LR clonasa™II se recogen en la Tabla 58, y la reacción se llevó a cabo como indica el fabricante en las instrucciones. Los clones de expresión obtenidos se comprobaron mediante la digestión con la enzima de restricción *EcoRI* y mediante secuenciación.

Paso 2: Clonación de los productos de PCR en pCR8/GW/TOPO® obteniéndose los ‘clones de entrada’:



Paso 3: Recombinación LR de los clones de entrada con los vectores de destino, obteniéndose los clones de expresión, ‘presa’ y ‘cebo’.

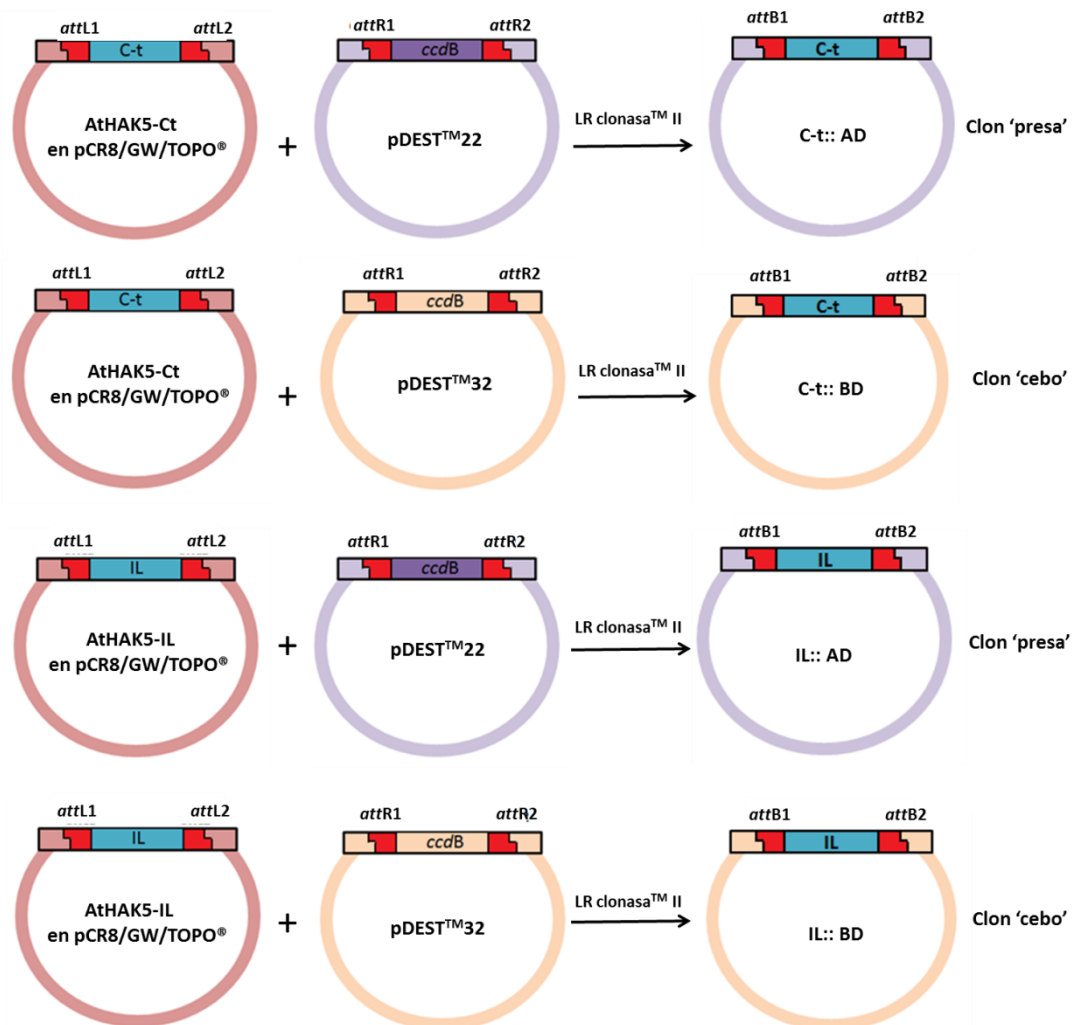


Figura 116. Esquema de la estrategia seguida para la generación de construcciones para el ensayo de doble híbrido en levadura. Paso 2, clonación de los productos de PCR obtenidos en el vector pCR8/GW/TOPO® obteniéndose los denominados ‘clones de entrada’. El paso 3 consistió en la recombinación de cada ‘clon de entrada’ con los vectores pDEST™22 y pDEST™32, obteniéndose los clones de expresión ‘cebo’ y ‘presa’, para cada uno de los dominios de AtHAK5 ensayados: C-terminal e ‘Internal Loop’.

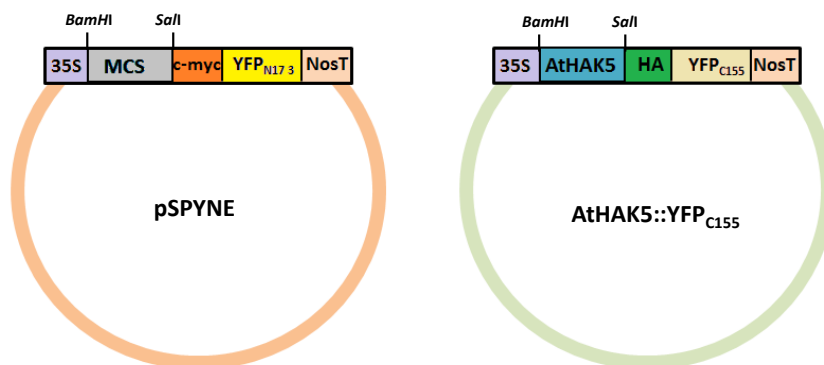
Tabla 58. Reactivos utilizados para la reacción de recombinación con LR clonasa™II.

Clon de entrada	2 µL
Vector de destino	1 µL
LR clonasa	2 µL
Tampón TE pH=8	3 µL
Volumen Final	8 µL
Proteinasa K	1 µL

ANEXO 8. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA EL ENSAYO DE BIFC.

Las construcciones SOS1::YFP_{N173}, SOS1::YFP_{C155} y HAK5::YFP_{C155} fueron donadas amablemente por el Dr. Quintero (IBVF-CSIC), al igual que los plásmidos pSPYNE y pSPYCE. La construcción p19 pBin61 fue cedida amablemente por el Dr. Aranda del Departamento de Patología Vegetal (CEBAS-CSIC). La construcción HAK5::YFP_{N173} se obtuvo siguiendo la estrategia reflejada en la Figura 117. El primer paso consistió en la digestión de la secuencia de AtHAK5 de la construcción AtHAK5::YFP_{C155} y del vector pSPYNE con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I (Figura 117, Paso 1), seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado para cada uno. Una vez purificados los fragmentos, se procedió a su ligamiento mediante la utilización de la enzima T4 ADN ligasa, obteniéndose la secuencia de AtHAK5 fusionada al dominio N-terminal de la proteína YFP, en el plásmido pSPYNE (Figura 117, Paso 2).

Paso 1: Digestión enzimática con *Bam*HI y *Sal*I del plásmido pSPYNE y de AtHAK5 en pSPYCE.



Paso 2: Purificación de los fragmentos de interés y ligamiento de ambos.

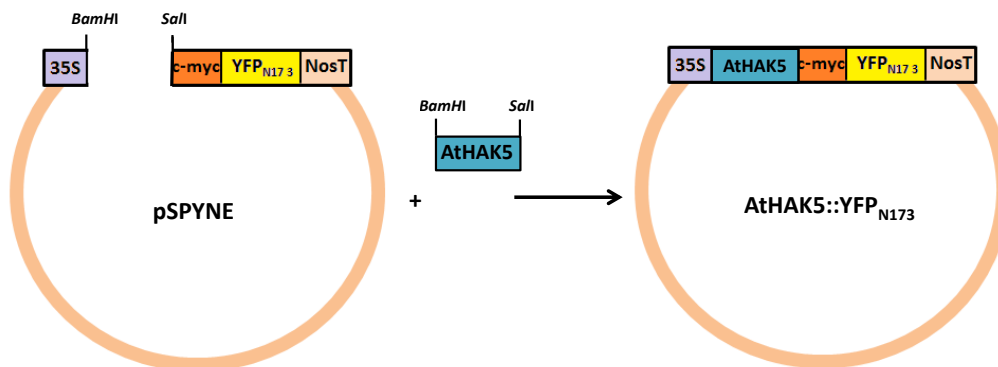


Figura 117. Esquema de la estrategia seguida para la generación de la construcción AtHAK5::YFP_{N173} para el ensayo de doble híbrido en levadura. El paso 1 consistió en la digestión con *Bam*HI y *Sal*I del plásmido pSPYNE y de la construcción AtHAK5::YFP_{C155} para la posterior y ligamiento de los fragmentos de interés (Paso 2).

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, M. A., Younis, M. E. y Shukry, W. M.** 1991. Plant-growth, metabolism and adaptation in relation to stress conditions . Effect of salinity on the internal solute concentrations in *Phaseolus-vulgaris*. *Journal of Plant Physiology*, 138, 722-727.
- Abeles, F., Morgan P.W. Y Saltveit M.E.** 1992. *Ethylene in Plant Biology*. Academic Press, Elsevier Inc.
- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G. y Hedrich, R.** 2000. GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Letters*, 486, 93-98.
- Adams, E., Abdollahi, P. y Shin, R.** 2013. Cesium inhibits plant growth through jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 4545-4559.
- Adams, J. A.** 2003. Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: Is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry*, 42, 601-607.
- Ahn, S. J., Shin, R. y Schachtman, D. P.** 2004. Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K⁺ uptake. *Plant Physiology*, 134, 1135-1145.
- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K. y Kudla, J.** 2001. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinases. *Embo Journal*, 20, 1051-1063.
- Aleman, F., Caballero, F., Ródenas, R., Rivero, R. M., Martínez, V. y Rubio, F.** 2014. The F130S point mutation in the *Arabidopsis* high-affinity K⁺ transporter AtHAK5 increases K⁺ over Na⁺ and Cs⁺ selectivity and confers Na⁺ and Cs⁺ tolerance to yeast under heterologous expression. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V. y Rubio, F.** 2009a. Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K⁺ transporters of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 263-269.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V. y Rubio, F.** 2009b. 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, V. y Rubio, F.** 2011. Root K⁺ acquisition in plants: the *Arabidopsis thaliana* model. *Plant and Cell Physiology*, 52, 1603-1612.
- Alonso-Blanco, C. y Koornneef, M.** 2000. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science*, 5, 22-29.
- Alshehbaz, I. A.** 1984. The tribes of cruciferae (Brassicaceae) in the southeastern United-States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 65, 343-373.
- Allan, A. C. y Fluhr, R.** 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 9, 1559-1572.
- Amtmann, A., Armengaud, P., Volkov, V. y Michael, R. B.** 2004. Potassium nutrition and salt stress. *Membrane transport in plants*. Oxford: Blackwell.
- Amtmann, A. y Blatt, M. R.** 2009. Regulation of macronutrient transport. *New Phytologist*, 181, 35-52.
- Amtmann, A., Hammond, J. P., Armengaud, P., White, P. J. y Callow, J. A.** 2006. Nutrient sensing and signalling in plants: Potassium and Phosphorus. *Advances in Botanical Research*. London: Academic Press.
- Amtmann, A. y Sanders, D.** 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research*, 29, 75-112.
- Amtmann, A., Troufflard, S. y Armengaud, P.** 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum*, 133, 682-691.
- Anschütz, U., Becker, D. y Shabala, S.** 2014. Going beyond nutrition: Regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *Journal of Plant Physiology*, 171, 670-687.
- Apel, K. y Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.

Bibliografía

- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B. y Fromm, H.** 1999. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant Journal*, 20, 171-182.
- Armengaud, P., Breitling, R. y Amtmann, A.** 2004. The potassium-dependent transcriptome of Arabidopsis reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiology*, 136, 2556-2576.
- Armengaud, P., Sulpice, R., Miller, A. J., Stitt, M., Amtmann, A. y Gibon, Y.** 2009. Multilevel analysis of primary metabolism provides new insights into the role of potassium nutrition for glycolysis and nitrogen assimilation in Arabidopsis Roots. *Plant Physiology*, 150, 772-785.
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T. A., Lawrenson, T., Sablowski, R. y Ostergaard, L.** 2010. Gibberellins control fruit patterning in Arabidopsis thaliana. *Genes & Development*, 24, 2127-2132.
- Arraj, J. A. y Marinus, M. G.** 1983. Phenotypic reversal in dam mutants of Escherichia coli k-12 by a recombinant plasmid containing the dam⁺ gene. *Journal of Bacteriology*, 153, 562-565.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., Sherlock, G. y Gene Ontology, C.** 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25, 25-29.
- Ashley, M. K., Grant, M. y Grabov, A.** 2006. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *Journal of Experimental Botany*, 57, 425-436.
- Bacha, H., Ródenas, R., López-Gómez, E., García-Legaz, M. F., Nieves-Cordones, M., Rivero, R. M., Martínez, V., Botella, M. Á. y Rubio, F.** 2015. High Ca²⁺ reverts the repression of high-affinity K⁺ uptake produced by Na⁺ in Solanum lycopersicum L. (var. microtom) plants. *Journal of Plant Physiology*, 180, 72-79.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J. M. y Sheen, J.** 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448, 938-U10.
- Bai, Y., Sunarti, S., Kissoudis, C., Visser, R. G. F. y Van Der Linden, C. G.** 2018. The role of tomato WRKY genes in plant responses to combined abiotic and biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 801.
- Balague, C., Lin, B. Q., Alcon, C., Flottes, G., Malmstrom, S., Kohler, C., Neuhaus, G., Pelletier, G., Gaymard, F. y 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. y Rodríguez-Navarro, A.** 2002. Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiology*, 130, 784-795.
- Bañuelos, M. A., Quintero, F. J. y Rodríguez-Navarro, A.** 1995. Functional expression of the ENA1(PMR2)-ATPase of Saccharomyces cerevisiae in Schizosaccharomyces pombe. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1229, 233-238.
- Barberon, M., Vermeer, J. E. M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T. G., Humbel, B. M., Nawrath, C., Takano, J., Salt, D. E. y Geldner, N.** 2016. Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell*, 164, 447-459.
- Baron, K. N., Schroeder, D. F. y Stasolla, C.** 2014. GEM-Related 5 (GER5), an ABA and stress-responsive GRAM domain protein regulating seed development and inflorescence architecture. *Plant Sciences*, 223, 153-66.
- Batistic, O. y Kudla, J.** 2004. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta*, 219, 915-924.
- Batistic, O. y Kudla, J.** 2009. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1793, 985-992.

- Batistic, O. y Kudla, J.** 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1820, 1283-1293.
- Batistic, O., Sorek, N., Schultke, S., Yalovsky, S. y Kudla, J.** 2008. Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20, 1346-1362.
- Batistic, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K. y Kudla, J.** 2010. CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant Journal*, 61, 211-22.
- Bayle, V., Arrighi, J. F., Creff, A., Nespoulous, C., Vialaret, J., Rossignol, M., Gonzalez, E., Paz-Ares, J. y Nussaume, L.** 2011. Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *Plant Cell*, 23, 1523-1535.
- Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K. y Hedrich, R.** 2004. AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15621-15626.
- Beers, E. P. y Mcdowell, J. M.** 2001. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 561-567.
- Behera, S., Long, Y., Schmitz-Thom, I., Wang, X.-P., Zhang, C., Li, H., Steinhorst, L., Manishankar, P., Ren, X.-L., Offenborn, J. N., Wu, W.-H., Kudla, J. y Wang, Y.** 2017. Two spatially and temporally distinct Ca²⁺ signals convey Arabidopsis thaliana responses to K⁺ deficiency. *New Phytologist*, 213, 727-738.
- Bell, J. N. B., Minski, M. J. y Grogan, H. A.** 1988. Plant uptake of radionuclides. *Soil Use and Management*, 4, 76-84.
- Ben-Yona, A. y Kanner, B. I.** 2012. An acidic amino acid transmembrane helix 10 residue conserved in the neurotransmitter:sodium:symporters is essential for the formation of the extracellular gate of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter GAT-1. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 7159-7168.
- Benito, B., Haro, R., Amtmann, A., Cuin, T. A. y Dreyer, I.** 2014. The twins K⁺ and Na⁺ in plants. *Journal of Plant Physiology*, 171, 723-731.
- Bergougnoux, V.** 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32, 170-189.
- Beyer, E. M.** 1976. Potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology*, 58, 268-271.
- Bindschedler, L. V., Dewdney, J., Blee, K. A., Stone, J. M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D. R., Ausubel, F. M. y Bolwell, G. P.** 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *Plant Journal*, 47, 851-863.
- Blatt, M., Tyrrell, M., Campanoni, P. y Sutter, J.** 2006. Mobility and traffic of K⁺ channels at the plasma membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 143, S159-S160.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. y Scheres, B.** 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, 433, 39-44.
- Bolker, J. A.** 1995. Model systems in developmental biology. *Bioessays*, 17, 451-455.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C. y Minibayeva, F.** 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1367-1376.
- Booth, I. R., Epstein, W., Giffard, P. M. y Rowland, G. C.** 1985. Roles of the trKb and trKc gene-products of Escherichia-coli in K⁺-transport. *Biochimie*, 67, 83-90.

Bibliografía

- Booth, I. R., Ferguson, G. P., Miller, S., Li, C., Gunasekera, B. y Kinghorn, S.** 2003. Bacterial production of methylglyoxal: a survival strategy or death by misadventure? *Biochemical Society Transactions*, 31, 1406-1408.
- Botella, M. A., Martínez, V., Pardines, J. y Cerdá, A.** 1997. Salinity induced potassium deficiency in maize plants. *Journal of plant Physiology*, 150, 200-205.
- Bowen, H. J. M.** 1979. *Environmental chemistry of the elements*. Academic Press, London ; New York.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54.
- Brauer, E. K., Ahsan, N., Dale, R., Kato, N., Coluccio, A. E., Piñeros, M. A., Kochian, L. V., Thelen, J. J. y Popescu, S. C.** 2016. The Raf-like kinase ILK1 and the high affinity K⁺ transporter HAK5 are required for innate immunity and abiotic stress response. *Plant Physiology*, 171, 1470-84
- Brett, C. L., Donowitz, M. y Rao, R.** 2005. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288, C223-C239.
- Britto, D. T. y Kronzucker, H. J.** 2008. Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum*, 133, 637-650.
- Broadley, M., Escobar Gutierrez, A., Bowen, H., Willey, N. y White, P.** 2001. Influx and accumulation of Cs⁺ by the akt1 mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. lacking a dominant K⁺ transport system. *Journal of Experimental Botany*, 52, 839-844.
- Brunellii, J. P. y Pall, M. L.** 1993. A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DNA-sequences. *Yeast*, 9, 1299-1308.
- Burnett, E. C., Desikan, R., Moser, R. C. y Neill, S. J.** 2000. ABA activation of an MBP kinase in *Pisum sativum* epidermal peels correlates with stomatal responses to ABA. *Journal of Experimental Botany*, 51, 197-205.
- Buschmann, P. H., Vaidyanathan, R., Gassmann, W. y Schroeder, J. I.** 2000. Enhancement of Na⁺ uptake currents, time-dependent inward-rectifying K⁺ channel currents, and K⁺ channel transcripts by K⁺ starvation in wheat root cells. *Plant Physiology*, 122, 1387-1398.
- Bush, D. S.** 1995. Calcium regulation in plant-cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 95-122.
- Butt, A. D., Blatt, M. R. y Ainsworth, C. C.** 1997. Expression, evolution and genomic complexity of potassium ion channel genes of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 150, 652-660.
- Byrt, C. S., Platten, J. D., Spielmeyer, W., James, R. A., Lagudah, E. S., Dennis, E. S., Tester, M. y Munns, R.** 2007. HKT1;5-like cation transporters linked to Na⁺ exclusion loci in wheat, Nax2 and Kna1. *Plant Physiology*, 143, 1918-1928.
- Caballero, F., Botella, M. A., Rubio, L., Fernández, J. A., Martínez, V. y Rubio, F.** 2012. A Ca²⁺-sensitive system mediates low-affinity K⁺ uptake in the absence of AKT1 in *Arabidopsis* plants. *Plant and Cell Physiology*, 53, 2047-2059.
- Carden, D. E., Walker, D. J., Flowers, T. J. y Miller, A. J.** 2003. Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiology*, 131, 676-683.
- Carraretto, L., Formentin, E., Teardo, E., Checchetto, V., Tomizioli, M., Morosinotto, T., Giacometti, G. M., Finazzi, G. y Szabo, I.** 2013. A thylakoid-located two-pore K⁺ channel controls photosynthetic light utilization in plants. *Science*, 342, 114-118.
- Cellier, F., Conejero, G., Ricaud, L., Luu, D. T., Lepetit, M., Gosti, F. y Casse, F.** 2004. Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis. *The Plant Journal*, 39, 834-846.
- Cline, J. F. y Hungate, F. P.** 1960. Accumulation of Potassium, Cesium, and Rubidium in bean plants grown in nutrient solutions. *Plant Physiology*, 35, 826-9.

- Coker, J. S. y Davies., E** 2003. Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data. *Biotechniques*, 35, 740-2, 744, 746.
- Colcombet, J. y Hirt, H.** 2008. Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, 413, 217-226.
- Corratgé-Faillie, C., Jabnoune, M., Zimmermann, S., Véry, A. A., Fizames, C. y Sentenac, H.** 2010. Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 2511-2532.
- Coskun, D., Britto, D. T., Kochian, L. V. y Kronzucker, H. J.** 2016. How high do ion fluxes go? A re-evaluation of the two-mechanism model of K⁺ transport in plant roots. *Plant Sciences*, 243, 96-104.
- Costa, A. y Kudla, J.** 2015. Colorful Insights: Advances in Imaging Drive Novel Breakthroughs in Ca²⁺ Signaling. *Molecular Plant*, 8, 352-355.
- Cuellar, T., Pascaud, F., Verdeil, J. L., Torregrosa, L., Dam-Blondon, A. F., Thibaud, J. B., Sentenac, H. y Gaillard, I.** 2010. A grapevine Shaker inward K⁺ channel activated by the calcineurin B-like calcium sensor 1-protein kinase CIPK23 network is expressed in grape berries under drought stress conditions. *Plant Journal*, 61, 58-69.
- Cuin, T. A., Miller, A. J., Laurie, S. A. y Leigh, R. A.** 2003. Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany*, 54, 657-661.
- Culham, D. E., Lasby, B., Marangoni, A. G., Milner, J. L., Steer, B. A., Vannues, R. W. y Wood, J. M.** 1993. Isolation and sequencing of Escherichia coli gene PROP reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline betaine transporter, PROP. *Journal of Molecular Biology*, 229, 268-276.
- Czempinski, K., Frachisse, J. M., Maurel, C., Barbier-Brygoo, H. y Mueller-Roeber, B.** 2002. Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis 'two-pore' K⁺ channel KCO1. *Plant Journal*, 29, 809-820.
- Czempinski, K., Gaedeke, N., Zimmermann, S. y Muller-Rober, B.** 1999. Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *Journal of Experimental Botany*, 50, 955-966.
- Czikkel, B. y P Maxwell, D.** 2007. NtGRAS1, a novel stress-induced member of the GRAS family in tobacco, localizes to the nucleus. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1220-30
- Chanroj, S., Wang, G. Y., Venema, K., Zhang, M. W., Delwiche, C. F. y Sze, H.** 2012. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H⁺ antiporters from algae to flowering plants. *Frontiers in Plant Science*, 3, 18.
- Chaves-Sanjuan, A., Sanchez-Barrena, M. J., Gonzalez-Rubio, J. M., Moreno, M., Ragel, P., Jimenez, M., Pardo, J. M., Martinez-Ripoll, M., Quintero, F. J. y Albert, A.** 2014. Structural basis of the regulatory mechanism of the plant CIPK family of protein kinases controlling ion homeostasis and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, E4532- E4541
- Cheeseman, J. M.** 1982. Pump-leak sodium fluxes in low salt corn roots. *Journal of Membrane Biology*, 70, 157-164.
- Cheeseman, J. M. y Hanson, J. B.** 1979. Energy-linked potassium influx as related to cell potential in corn roots. *Plant Physiology*, 64, 842-845.
- Chen, G., Hu, Q., Luo, L., Yang, T., Zhang, S., Hu, Y., Yu, L. y Xu, G.** 2015. Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant Cell Environmental*, 38, 2747-65.
- Chen, L., Yang, Y., Liu, C., Zheng, Y., Xu, M., Wu, N., Sheng, J. y Shen, L.** 2015. Characterization of WRKY transcription factors in Solanum lycopersicum reveals collinearity and their expression patterns under cold treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 464, 962-8.

- Chen, X. F., Chang, M. C., Wang, B. Y. y Wu, R.** 1997. Cloning of a Ca²⁺-ATPase gene and the role of cytosolic Ca²⁺ in the gibberellin-dependent signaling pathway in aleurone cells. *Plant Journal*, 11, 363-371.
- Chen, X. F., Gu, Z. M., Xin, D. D., Hao, L. A., Liu, C. J., Huang, J., Ma, B. J. y Zhang, H. S.** 2011. Identification and characterization of putative CIPK genes in maize. *Journal of Genetics and Genomics*, 38, 77-87.
- Chen, Z., Pottosin, I. I., Cuin, T. A., Fuglsang, A. T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M. G., Newman, I. A. y Shabala, S.** 2007. Root plasma membrane transporters controlling K⁺/Na⁺ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology*, 145, 1714-1725.
- Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Grant, J. J., Batistic, O., Li, L., Kim, B. G., Lee, S. C., Kudla, J. y Luan, S.** 2007. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis. *Plant Journal*, 52, 223-239.
- Cherel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcon, C., Sentenac, H. y Thibaud, J. B.** 2002. Physical and functional interaction of the Arabidopsis K⁺ channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell*, 14, 1133-1146.
- Chinchilla, D., Merchan, F., Megias, M., Kondorosi, A., Sousa, C. y Crespi, M.** 2003. Ankyrin protein kinases: a novel type of plant kinase gene whose expression is induced by osmotic stress in alfalfa. *Plant Molecular Biology*, 51, 555-566.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L. y Solano, R.** 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448, 666-U4.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Chothia, C. y Lesk, A. M.** 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *Embo Journal*, 5, 823-826.
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. y Hieter, P.** 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, 110, 119-22.
- Chung, M. Y., Vrebalov, J., Alba, R., Lee, J., Mcquinn, R., Chung, J. D., Klein, P. y Giovannoni, J.** 2010. A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SLAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *Plant Journal*, 64, 936-47.
- D'angelo, C., Weinel, S., Batistic, O., Pandey, G. K., Cheong, Y. H., Schültke, S., Albrecht, V., Ehlert, B., Schulz, B., Harter, K., Luan, S., Bock, R. y Kudla, J.** 2006. Alternative complex formation of the Ca²⁺-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis. *Plant Journal*, 48, 857-872.
- Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H. y Cherel, I.** 1997. Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *EMBO Journal*, 16, 3455-63.
- Daras, G., Rigas, S., Tsitsekian, D., Iacovides, T. A. y Hatzopoulos, P.** 2015. Potassium transporter TRH1 subunits assemble regulating root-hair elongation autonomously from the cell fate determination pathway. *Plant Science*, 231, 131-137.
- Das, R. y Pandey, G. K.** 2010. Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling. *Current Genomics*, 11, 2-13.
- Davenport, R. J., Munoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A. y Tester, M.** 2007. The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment*, 30, 497-507.
- Davis, J. J.** 1963. Cesium and its relationship to potassium in ecology. *Radioecology*. Reinhold, New York, .

- Deeken, R., Sanders, C., Ache, P. y Hedrich, R.** 2000. Developmental and light-dependent regulation of a phloem-localised K⁺ channel of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 23, 285-290.
- Demidchik, V., Bowen, H. C., Maathuis, F. J. M., Shabala, S. N., Tester, M. A., White, P. J. y Davies, J. M.** 2002. *Arabidopsis thaliana* root non-selective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *Plant Journal*, 32, 799-808.
- Demidchik, V. y Maathuis, F.** 2007. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*, 175, 387 - 404.
- Demidchik, V., Shabala, S. N. y Davies, J. M.** 2007. Spatial variation in H₂O₂ response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca²⁺ flux and plasma membrane Ca²⁺ channels. *Plant Journal*, 49, 377-386.
- Dennison, K. L., Robertson, W. R., Lewis, B. D., Hirsch, R. E., Sussman, M. R. y Spalding, E. P.** 2001. Functions of AKT1 and AKT2 Potassium channels determined by studies of single and double mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127, 1012-1019.
- Dietrich, P., Anshütz, U., Kugler, A. y Becker, D.** 2010. Physiology and biophysics of plant ligand-gated ion channels. *Plant Biology*, 12, 80-93.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A. L., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. y Mackinnon, R.** 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280, 69-77.
- Drechsler, N., Zheng, Y., Bohner, A., Nobmann, B., Von Wirén, N., Kunze, R. y Rausch, C.** 2015a. Nitrate-dependent control of shoot K homeostasis by NPF7.3/NRT1.5 and SKOR in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 169, 2832-2847.
- Drechsler, N., Zheng, Y., Bohner, A., Nobmann, B., Von Wirén, N., Kunze, R. y Rausch, C.** 2015b. Nitrate-dependent control of shoot K⁺ homeostasis by the nitrate transporter1/peptide transporter family member NPF7.3/NRT1.5 and the Stelar K⁺ Outward Rectifier SKOR in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 169, 2832-2847.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Muller-Rober, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B. y Hedrich, R.** 1997. Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophysical Journal*, 72, 2143-50.
- Drinkwater, L. E. y Snapp, S. S.** 2007. Nutrients in agroecosystems: Rethinking the management paradigm. *Advances in Agronomy, Vol 92*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Du, W. M., Lin, H. X., Chen, S., Wu, Y. S., Zhang, J., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Wu, W. H. y Guo, Y.** 2011. Phosphorylation of SOS3-like calcium-binding proteins by their interacting SOS2-like protein kinases is a common regulatory mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156, 2235-2243.
- Duby, G., Hosy, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H. y Thibaud, J. B.** 2008. AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels. *Plant Journal*, 53, 115-123.
- Dunkel, M., Latz, A., Schumacher, K., Wuller, T., Becker, D. y Hedrich, R.** 2008. Targeting of vacuolar membrane localized members of the TPK channel family. *Molecular Plant*, 1, 938-949.
- Durell, S. R. y Guy, H. R.** 1999. Structural Models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 Symporters Based on the Structure of the KcsA K⁺ Channel. *Biophysical Journal*, 77, 789-807.
- Edwards, A. N., Patterson-Fortin, L. M., Vakulskas, C. A., Mercante, J. W., Potrykus, K., Vinella, D., Camacho, M. I., Fields, J. A., Thompson, S. A., Georgellis, D., Cashel, M., Babitzke, P. y Romeo, T.** 2011. Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Molecular Microbiology*, 80, 1561-1580.
- Edwards, K., Johnstone, C. y Thompson, C.** 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19, 1349-1349.

Bibliografía

- Elble, R.** 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques*, 13, 18-20.
- Engels, C. y Marschner, H.** 1992. Adaptation of potassium translocation into the shoot of maize (*Zea mays*) to shoot demand: Evidence for xylem loading as a regulating step. *Physiologia Plantarum*, 86, 263-268.
- Epstein, E.** 1966. Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature*, 212, 1324-1327.
- Epstein, E., Elzam, O. E. y Rains, D. W.** 1963. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 49, 684-&.
- Epstein, E. y Hagen, C. E.** 1952. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology*, 27, 457-474.
- Evans, N. H.** 2003. Modulation of guard cell plasma membrane potassium currents by methyl jasmonate. *Plant Physiology*, 131, 8-11.
- Ferguson, G. P., Nikolaev, Y., Mclaggan, D., Maclean, M. y Booth, I. R.** 1997. Survival during exposure to the electrophilic reagent N-ethylmaleimide in *Escherichia coli*: Role of KefB and KefC potassium channels. *Journal of Bacteriology*, 179, 1007-1012.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Tecle, I. Y., Strickler, S. R., Bombarely, A., Fisher-York, T., Pujar, A., Foerster, H., Yan, A. y Mueller, L. A.** 2015. The Sol Genomics Network (SGN)--from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, 43, D1036-41.
- Fields, S. y Song, O. K.** 1989. A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature*, 340, 245-246.
- Forieri, I., Sticht, C., Reichelt, M., Grerz, N., Hawkesford, M. J., Malagoli, M., Wirtz, M. y Hell, R.** 2017. System analysis of metabolism and the transcriptome in *Arabidopsis thaliana* roots reveals differential co-regulation upon iron, sulfur and potassium deficiency. *Plant Cell and Environment*, 40, 95-107.
- Frazeo, A. C., Perteo, G., Jaffe, A. E., Langmead, B., Salzberg, S. L. y Leek, J. T.** 2014. Flexible isoform-level differential expression analysis with Ballgown. *bioRxiv*.
- Frederick M. Ausubel, R. B., Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, y Struhl, K.** 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Friml, J., Benkova, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G. y Palme, K.** 2002. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, 108, 661-673.
- Fu, H. H. y Luan, S.** 1998. AtKuP1: a dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 63-73.
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M. y Trapnell, C.** 2011. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*, 8, 469-477.
- Garcia-Martinez, J. L.** 1997. Gibberellin metabolism and control of fruit growth. *Eight International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production*.
- García, M. J., Romera, F. J., Lucena, C., Alcántara, E. y Pérez-Vicente, R.** 2015. Ethylene and the regulation of physiological and morphological responses to nutrient deficiencies. *Plant Physiology*, 169, 51-60.
- Gassmann, W., Rubio, F. y Schroeder, J. I.** 1996. Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant Journal*, 10, 869-882.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferriere, N., Thibaud, J. B. y Sentenac, H.** 1998. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*, 94, 647-55.
- Geiger, D., Becker, D., Vosloh, D., Gambale, F., Palme, K., Rehers, M., Anschuetz, U., Dreyer, I., Kudla, J. y Hedrich, R.** 2009. Heteromeric AtKC1/AKT1 channels in

- Arabidopsis roots facilitate growth under K⁺ limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 21288-21295.
- Genies, L., Orjollet, D., Carasco, L., Camilleri, V., Frelon, S., Vavasseur, A., Leonhardt, N. y Henner, P.** 2017. Uptake and translocation of cesium by Arabidopsis thaliana in hydroponics conditions: Links between kinetics and molecular mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 138, 164-172.
- Gibeaut, D. M., Hulett, J., Cramer, G. R. y Seemann, J. R.** 1997. Maximal biomass of Arabidopsis thaliana using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiology*, 115, 317-319.
- Gierth, M. y Maser, P.** 2007. Potassium transporters in plants - Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters*, 581, 2348-2356.
- Gierth, M., Maser, P. y Schroeder, J. I.** 2005. The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in Arabidopsis Roots. *Plant Physiology*, 137, 1105-1114.
- Gifford, M. L., Dean, A., Gutierrez, R. A., Coruzzi, G. M. y Birnbaum, K. D.** 2008. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 803-808.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K. y Maathuis, F. J. M.** 2007. The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 10726-10731.
- Gomez-Porras, J. L., Riaño-Pachón, D. M., Benito, B., Haro, R., Sklodowski, K., Rodríguez-Navarro, A. y Dreyer, I.** 2012. Phylogenetic analysis of K⁺ transporters in bryophytes, lycophytes, and flowering plants indicates a specialization of vascular plants. *Frontiers in Plant Science*, 3, 167.
- Gradmann, D. y Hoffstadt, J.** 1998. Electrocoupling of ion transporters in plants: Interaction with internal ion concentrations. *Journal of Membrane Biology*, 166, 51-59.
- Guilfoyle, T. J. y Hagen, G.** 2007. Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 453-460.
- Guo, Y., Qiu, Q.-S., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Ohta, M., Zhang, C., Schumaker, K. S. y Zhu, J.-K.** 2004. Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and c-terminal regulatory domain for salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell Online*, 16, 435-449.
- Gupta, S., Shi, X., Lindquist, I. E., Devitt, N., Mudge, J. y Rashotte, A. M.** 2013. Transcriptome profiling of cytokinin and auxin regulation in tomato root. *Journal of Experimental Botany*, 64, 695-704.
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K. y Chowdhuri, D. K.** 2010. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences*, 86, 377-84.
- Halford, N. G. y Hey, S. J.** 2009. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemical Journal*, 419, 247-259.
- Hamilton, E. S., Jensen, G. S., Maksaev, G., Katims, A., Sherp, A. M. y Haswell, E. S.** 2015. Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science*, 350, 438-441.
- Hammond, J. P. y White, P. J.** 2008. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany*, 59, 93-109.
- Hampton, C. R., Bowen, H. C., Broadley, M. R., Hammond, J. P., Mead, A., Payne, K. A., Pritchard, J. y White, P. J.** 2004. Cesium toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136, 3824-3837.
- Han, M., Wu, W., Wu, W.-H. y Wang, Y.** 2016. Potassium transporter KUP7 is involved in K⁺ acquisition and translocation in Arabidopsis root under K⁺-limited conditions. *Molecular Plant*, 9, 437-446.

Bibliografía

- Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. *DNA cloning: A practical approach*. Oxford: IRL Press.
- Hanks, S. K. y Hunter, T.** 1995. Protein kinases .6. the eukaryotic protein-kinase superfamily - kinase (catalytic) domain-structure and classification. *Faseb Journal*, 9, 576-596.
- Harberd, N. P., Belfield, E. y Yasumura, Y.** 2009. The angiosperm Gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: How an "Inhibitor of an Inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell*, 21, 1328-1339.
- Hardtke, C. S. y Berleth, T.** 1998. The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *Embo Journal*, 17, 1405-1411.
- Harmon, A. C., Gribskov, M. y Harper, J. F.** 2000. CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends in Plant Science*, 5, 154-159.
- Haro, R., Banuelos, M. A. y Rodriguez-Navarro, A.** 2010. High-affinity sodium uptake in land plants. *Plant and Cell Physiology*, 51, 68-79.
- Haro, R., Banuelos, M. A., Senn, M. E., Barrero-Gil, J. y Rodriguez-Navarro, A.** 2005. HKT1 mediates sodium uniport in roots. pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiology*, 139, 1495-1506.
- Harper, J. F., Hong, B. M., Hwang, I. D., Guo, H. Q., Stoddard, R., Huang, J. F., Palmgren, M. G. y Sze, H.** 1998. A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 1099-1106.
- Hartje, S., Zimmermann, S., Klonus, D. y Mueller-Roeber, B.** 2000. Functional characterisation of LKT1, a K⁺ uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K⁺ channel SKT1 after expression in *Xenopus* oocytes. *Planta*, 210, 723-731.
- Hashimoto, K., Eckert, C., Anschutz, U., Scholz, M., Held, K., Waadt, R., Reyer, A., Hippler, M., Becker, D. y Kudla, J.** 2012. Phosphorylation of Calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting Protein Kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 7956-7968.
- Hauser, F. y Horie, T.** 2010. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant Cell Environmental*, 33, 552-565.
- Hauvermale, A. L., Ariizumi, T. y Steber, C. M.** 2012. Gibberellin signaling: A theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiology*, 160, 83-92.
- Hedden, P. y Kamiya, Y.** 1997. Gibberellin biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 431-460.
- Hedden, P. y Proebsting, W. M.** 1999. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, 119, 365-370.
- Heginbotham, L., Abramson, T. y Mackinnon, R.** 1992. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science*, 258, 1152-1155.
- Heginbotham, S. H. y Mackinnon, R.** 1993. Use of chimeras to localize regions determining ion selectivity in potassium channels. *Biophysics Journal*, 64, A16.
- Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratge-Faillie, C., Offenborn, J. N., Lacombe, B., Dreyer, I., Thibaud, J. B. y Kudla, J.** 2011. Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Research*, 21, 1116-30.
- Heredia, M. A., Zapico, R., García-Sánchez, M. a. J. y Fernández, J. A.** 2002. Effect of calcium, sodium and pH on uptake and accumulation of radiocesium by *Riccia fluitans*. *Aquatic Botany*, 74, 245-256.

- Hernandez, M., Fernandez-Garcia, N., Garcia-Garma, J., Rubio-Asensio, J. S., Rubio, F. y Olmos, E.** 2012. Potassium starvation induces oxidative stress in *Solanum lycopersicum* L. roots. *Journal of Plant Physiology*, 169, 1366-1374.
- Hidalgo, P. y Mackinnon, R.** 1995. Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science*, 268, 307-310.
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. y Sussman, M. R.** 1998. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, 280, 918-21.
- Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C. y Tsay, Y. F.** 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 138, 1184-1194.
- Hoagland, D. R. y Arnon, D. I.** 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station, Berkeley, USA*, 347, 1-32.
- Hodge, A.** 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*, 162, 9-24.
- Holsters, M., De Waele, D., Depicker, A., Messens, E., Van Montagu, M. y Schell, J.** 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Genetics and Genomics*, 163, 181-7.
- Hong, J. P., Takeshi, Y., Kondou, Y., Schachtman, D. P., Matsui, M. y Shin, R.** 2013. Identification and characterization of transcription factors regulating *Arabidopsis* HAK5. *Plant Cell Physiology*, 54, 1478-90.
- Honsbein, A., Sokolovski, S., Grefen, C., Campanoni, P., Pratelli, R., Paneque, M., Chen, Z., Johansson, I. y Blatt, M. R.** 2009. A tripartite SNARE-K⁺ channel complex mediates in channel-dependent K⁺ nutrition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21, 2859-2877.
- Hoopen, F. T., Cuin, T. A., Pedas, P., Hegelund, J. N., Shabala, S., Schjoerring, J. K. y Jahn, T. P.** 2010. Competition between uptake of ammonium and potassium in barley and *Arabidopsis* roots: molecular mechanisms and physiological consequences. *Journal of Experimental Botany*, 61, 2303-2315.
- Horie, T., Hauser, F. y Schroeder, J. I.** 2009. HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends in Plant Science*, 14, 660-668.
- Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S. y Shinmyo, A.** 2001. Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant Journal*, 27, 129-138.
- Howe, G. A. y Schilmiller, A. L.** 2002. Oxylipin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 230-236.
- 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., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J. K. y Harmon, A. C.** 2003. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology*, 132, 666-680.
- Huala, E., Dickerman, A. W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., Lafond, F., Hanley, D., Kiphart, D., Zhuang, M. Z., Huang, W., Mueller, L. A., Bhattacharyya, D., Bhaya, D., Sobral, B. W., Beavis, W., Meinke, D. W., Town, C. D., Somerville, C. y Rhee, S. Y.** 2001. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Research*, 29, 102-105.
- Huang, S., Spielmeier, W., Lagudah, E. S., James, R. A., Platten, J. D., Dennis, E. S. y Munns, R.** 2006. A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in Durum wheat. *Plant Physiology*, 142, 1718-1727.
- Huang, W., Peng, S., Xian, Z., Lin, D., Hu, G., Yang, L., Ren, M. y Li, Z.** 2017. Overexpression of a tomato miR171 target gene SlGRAS24 impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. *Plant Biotechnology Journal*, 15, 472-488.

- Huang, W., Xian, Z., Kang, X., Tang, N. y Li, Z. 2015. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of GRAS gene family in tomato. *BMC Plant Biology*, 15, 209.
- Ishikawa, S., Hayashi, S., Abe, T., Igura, M., Kuramata, M., Tanikawa, H., Iino, M., Saito, T., Ono, Y., Ishikawa, T., Fujimura, S., Goto, A. y Takagi, H. 2017. Low-cesium rice: mutation in OsSOS2 reduces radiocesium in rice grains. *Scientific Reports*, 7, 2432.
- Jeanguenin, L., Alcon, C., Duby, G., Boeglin, M., Chérel, I., Gaillard, I., Zimmermann, S., Sentenac, H. y Véry, A.-A. 2011. AtKC1 is a general modulator of Arabidopsis inward shaker channel activity. *The Plant Journal*, 67, 570-582.
- Jiang, C. y Fu, X. 2007. GA action: turning on de-DELLA repressing signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 461-465.
- Jung, J.-Y., Shin, R. y Schachtman, D. P. 2009. Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21, 607-621.
- Jung, J. Y., Shin, R. y Schachtman, D. P. 2009. Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21, 607-621.
- Jungk, A. 2001. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164, 121-129.
- Kanter, U., Hauser, A., Michalke, B., Dräxl, S. y Schäffner, A. R. 2010. Caesium and strontium accumulation in shoots of Arabidopsis thaliana: genetic and physiological aspects. *Journal of Experimental Botany*.
- Kaplan, B., Sherman, T. y Fromm, H. 2007. Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters*, 581, 2237-2246.
- Karkute, S. G., Easwaran, M., Gujjar, R. S., Piramanayagam, S. y Singh, M. 2015. Protein modeling and molecular dynamics simulation of SIWRKY4 protein cloned from drought tolerant tomato (*Solanum habrochaites*) line EC520061. *Journal of Molecular Model*, 21, 255.
- Karley, A. J. y White, P. J. 2009. Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 291-298.
- Karlova, R., Rosin, F. M., Busscher-Lange, J., Parapunova, V., Do, P. T., Fernie, A. R., Fraser, P. D., Baxter, C., Angenent, G. C. y De Maagd, R. A. 2011. Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell*, 23, 923-41.
- Kayser, M. y Isselstein, J. 2005. Potassium cycling and losses in grassland systems: a review. *Grass and Forage Science*, 60, 213-224.
- Kazan, K. 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 20, 219-229.
- Kellermeier, F., Armengaud, P., Seditas, T. J., Danku, J., Salt, D. E. y Amtmann, A. 2014. Analysis of the root system architecture of arabidopsis provides a quantitative readout of crosstalk between nutritional signals. *The Plant Cell*, 26, 1480-1496.
- Kerppola, T. K. 2006a. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature Protocols*, 1, 1278-1286.
- Kerppola, T. K. 2006b. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 449-456.
- Kim, D., Landmead, B. y Salzberg, S. L. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12, 357-U121.
- Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N. y Schroeder, J. I. 1998. AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell*, 10, 51-62.
- Kim, M. J., Ciani, S. y Schachtman, D. P. 2010. A peroxidase contributes to ROS production during Arabidopsis root response to potassium deficiency. *Molecular Plant*, 3, 420-7.

- Kim, M. J., Ruzicka, D., Shin, R. y Schachtman, D. P.** 2012. The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.11 modulates plant response to low-potassium conditions. *Molecular Plant*, 5, 1042-1057.
- Kim, M. J., Shin, R. y Schachtman, D. P.** 2009. A nuclear factor regulates abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151, 1433-1445.
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N. y Schroeder, J. I.** 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 561-591.
- Knight, H.** 2000. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 195*, 195, 269-324.
- Kochian, L. V., Shaff, J. E. y Lucas, W. J.** 1989. High affinity K⁺ uptake in maize roots. *Plant Physiology*, 91, 1202-1211.
- Kolukisaoglu, U., Weinel, S., Blazevic, D., Batistic, O. y 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.
- Koncz, C. y Schell, J.** 1986. The promoter of *tl*-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular & General Genetics*, 204, 383-396.
- Kotak, S., Vierling, E., Baumlein, H. y Von Koskull-Doring, P.** 2007. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. *Plant Cell*, 19, 182-95.
- Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B. y Wasternack, C.** 2000. Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "Oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology*, 123, 177-187.
- Kramer, E. M.** 2004. PIN and AUX/LAX proteins: their role in auxin accumulation. *Trends in Plant Science*, 9, 578-582.
- Kranz, A. R. Y. K., B.** 1987. *Genetic Resources in Arabidopsis*, Frankfurt.
- Kronzucker, H. J., Szczerba, M. W., Moazami-Goudarzi, M. a. R. Y. y Britto, D. T.** 2006. The cytosolic Na⁺ : K⁺ ratio does not explain salinity-induced growth impairment in barley: a dual-tracer study using ⁴²K⁺ and ²⁴Na⁺. *Plant, cell and environment*, 29, 2228-2237.
- Kronzucker, H. J., Szczerba, M. W., Schulze, L. M. y Britto, D. T.** 2008. Non-reciprocal interactions between K⁺ and Na⁺ ions in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, 59, 2793-2801.
- Kudla, J., Batistic, O. y Hashimoto, K.** 2010. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell*, 22, 541-563.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Gruissem, W. y Luan, S.** 1999. Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 4718-4723.
- Kunz, H. H., Gierth, M., Herdean, A., Satoh-Cruz, M., Kramer, D. M., Spetea, C. y Schroeder, J. I.** 2014. Plastidial transporters KEA1, -2, and -3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 7480-7485.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. y Thibaud, J.-B.** 2000. A shaker-like K⁺ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis. *Plant Cell*, 12, 837-851.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680-+.
- Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S. y Grignon, C.** 1996. Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant Journal*, 9, 195-203.

- Lamarck, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., Mcdougall, J. y Strom, A. R. 1991. DNA-sequence and analysis of the BET genes encoding the osmoregulatory choline glycine betaine pathway of escherichia-coli. *Molecular Microbiology*, 5, 1049-1064.
- Lan, W. Z., Lee, S. C., Che, Y. F., Jiang, Y. Q. y Luan, S. 2011. Mechanistic analysis of AKT1 regulation by the CBL-CIPK-PP2CA interactions. *Molecular Plant*, 4, 527-536.
- Laohavisit, A., Shang, Z., Rubio, L., Cuin, T. A., Very, A. A., Wang, A., Mortimer, J. C., Macpherson, N., Coxon, K. M., Battey, N. H., Brownlee, C., Park, O. K., Sentenac, H., Shabala, S., Webb, A. A. y Davies, J. M. 2012. Arabidopsis annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca^{2+} and K^{+} -permeable conductance in root cells. *Plant Cell*, 24, 1522-33.
- Lebaudy, A., Hosity, E., Simonneau, T., Sentenac, H., Thibaud, J. B. y Dreyer, I. 2008. Heteromeric K^{+} channels in plants. *Plant Journal*, 54, 1076-1082.
- Lebaudy, A., Pascaud, F., Very, A., Alcon, C., Dreyer, I. y Thibaud, J. 2010. Preferential KAT1-KAT2 heteromerization determines inward K^{+} current properties in Arabidopsis guard cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 6265-6274.
- Lebaudy, A., Very, A. A. y Sentenac, H. 2007. K^{+} channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters*, 581, 2357-2366.
- Lee, K., Song, E. H., Kim, H. S., Yoo, J. H., Han, H. J., Jung, M. S., Lee, S. M., Kim, K. E., Kim, M. C., Cho, M. J. y Chung, W. S. 2008. Regulation of MAPK phosphatase 1 (AtMKP1) by calmodulin in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 23581-23588.
- Lee, S. C., Lan, W. Z., Kim, B. G., Li, L., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Lu, G., Buchanan, B. B. y Luan, S. 2007. A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 15959-15964.
- Leigh, R. A. y Wyn Jones, R. G. 1984. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant-cell. *New Phytologist*, 97, 1-13.
- Lembrechts, J. 1993. A review of literature on the effectiveness of chemical amendments in reducing the soil-to-plant transfer of radiostrontium and radiocaesium. *Science of The Total Environment*, 137, 81-98.
- Leng, Q., Mercier, R. W., Hua, B. G., Fromm, H. y Berkowitz, G. A. 2002. Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiology*, 128, 400-410.
- Lepage, H., Evrard, O., Onda, Y., Lefevre, I., Laceby, J. P. y Ayrault, S. 2015. Depth distribution of cesium-137 in paddy fields across the Fukushima pollution plume in 2013. *J Environ Radioact*, 147, 157-64.
- Levchenko, V., Konrad, K. R., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G. y Hedrich, R. 2005. Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca^{2+} signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 4203-4208.
- Lewis, B. y Spalding, E. 1998. Nonselective block by La^{3+} of Arabidopsis ion channels involved in signal transduction. *The journal of membrane biology*, 162, 81-90.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. y Genome Project Data, P. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078-2079.
- Li, J., Long, Y., Qi, G.-N., Li, J., Xu, Z.-J., Wu, W.-H. y Wang, Y. 2014. The Os-AKT1 channel is critical for K^{+} uptake in rice roots and is modulated by the rice CBL1-CIPK23 complex. *The Plant Cell*, 26, 3387-402.
- Li, L., Kim, B. G., Cheong, Y. H., Pandey, G. K. y Luan, S. 2006. A Ca^{2+} signaling pathway regulates a K^{+} channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 12625-12630.
- Li, X., Borsics, T., Harrington, H. M. y 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.
- Linn, J., Ren, M., Berkowitz, O., Ding, W., Van Der Merwe, M. J., Whelan, J. y Jost, R.** 2017. Root cell-specific regulators of phosphate-dependent growth. *Plant Physiology*, 174, 1969-1989.
- Liu, L. L., Ren, H. M., Chen, L. Q., Wang, Y. y Wu, W. H.** 2013. A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein Kinase9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like Protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161, 266-77.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ddCT Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Luan, S.** 2009. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in Plant Sciences*, 14, 37-42.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S. y Grisse, W.** 2002. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, 14 Suppl, S389-400.
- Lyzenga, W. J., Sullivan, V., Liu, H. X. y Stone, S. L.** 2017. The kinase activity of Calcineurin B-like Interacting Protein Kinase 26 (CIPK26) influences its own stability and that of the ABA-regulated ubiquitin ligase, Keep on Going (KEG). *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Ma, H.-S., Liang, D., Shuai, P., Xia, X.-L. y Yin, W.-L.** 2010. The salt- and drought-inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 61, 4011-4019.
- Ma, T.-L., Wu, W.-H. y Wang, Y.** 2012. Transcriptome analysis of rice root responses to potassium deficiency. *BMC Plant Biology*, 12, 161.
- Maathuis, F. J., Ichida, A. M., Sanders, D. y Schroeder, J. I.** 1997a. Roles of higher plant K⁺ channels. *Plant Physiology*, 114, 1141-9.
- Maathuis, F. J. y Sanders, D.** 1994. Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9272-6.
- Maathuis, F. J. y Sanders, D.** 1996. Characterization of csi52, a Cs⁺ resistant mutant of Arabidopsis thaliana altered in K⁺ transport. *Plant Journal*, 10, 579-89.
- Maathuis, F. J. y Sanders, D.** 2001. Sodium uptake in Arabidopsis roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiology*, 127, 1617-25.
- Maathuis, F. J., Sanders, D. y Gradmann, D.** 1997b. Kinetics of high-affinity K⁺ uptake in plants, derived from K⁺- induced changes in current-voltage relationships. A modelling approach to the analysis of carrier-mediated transport. *Planta*, 203, 229-36.
- Maathuis, F. J. M.** 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 250-258.
- Maathuis, F. J. M. y 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., Forde, B. G., Palmgren, M. G., Rea, P. A., Williams, L. E., Sanders, D. y Amtmann, A.** 2003. Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant Journal*, 35, 675-692.
- Maathuis, F. J. M. y Sanders, D.** 1993a. Energization of potassium uptake in Arabidopsis thaliana *Planta*, 191, 302-307.
- Maathuis, F. J. M. y Sanders, D.** 1993b. Energization of potassium uptake in Arabidopsis-thaliana. *Planta*, 191, 302-307.
- Maathuis, F. J. M. y Sanders, D.** 1996. Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiologia Plantarum*, 96, 158-168.
- Mackinnon, R.** 2003. Potassium channels. *FEBS Lett*, 555, 62-5.

- Mackinnon, R. y Yellen, G.** 1990. Mutations affecting tea blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science*, 250, 276-279.
- Mao, J. J., Manik, S. M. N., Shi, S. J., Chao, J. T., Jin, Y. R., Wang, Q. y Liu, H. B.** 2016. Mechanisms and physiological roles of the CBL-CIPK networking system in *Arabidopsis thaliana*. *Genes*, 7.
- Marcel, D., Muller, T., Hedrich, R. y Geiger, D.** 2010. K⁺ transport characteristics of the plasma membrane tandem-pore channel TPK4 and pore chimeras with its vacuolar homologs. *FEBS Letters*, 584, 2433-2439.
- Marschner, P.** 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)*, San Diego, Academic Press.
- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K. A., Hoshi, T. y Hedrich, R.** 1999. AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7581-7586.
- Marti, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S. y Garcia-Martinez, J. L.** 2006. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2037-2047.
- Martínez-Cordero, M. A., Martínez, V. y Rubio, F.** 2005. High-affinity K⁺ uptake in pepper plants. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1553-1562.
- Martínez-Cordero, M. A., Martínez, V. y Rubio, F.** 2004. Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Molecular Biology*, 56, 413-421.
- Maser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Horie, T., Fairbairn, D. J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., Uozumi, N., Robertson, W., Sussman, M. R. y Schroeder, J. I.** 2002a. Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Letters*, 531, 157-161.
- Maser, P., Gierth, M. y Schroeder, J. I.** 2002b. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and Soil*, 247, 43-54.
- Mäser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E. P., Shinmyo, A., Oiki, S., Schroeder, J. I. y Uozumi, N.** 2002. Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 6428-6433.
- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I. N., Amtmann, A., Maathuis, F. J., Sanders, D., Harper, J. F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M. W., Salt, D. E., Kim, S. A. y Guerinot, M. L.** 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126, 1646-1667.
- Mayrose, M., Ekengren, S. K., Melech-Bonfil, S., Martin, G. B. y Sessa, G.** 2006. A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular Plant Pathology*, 7, 593-604.
- Mcainch, M. R. y Hetherington, A. M.** 1998. Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends in Plant Science*, 3, 32-36.
- Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H. y Appel, T.** 2001. *Principles on plant nutrition*, Dordrecht, Kluwer.
- Meyerowitz, E. M.** 1987. *Arabidopsis-thaliana*. *Annual Review of Genetics*, 21, 93-111.
- Miller, S., Douglas, R. M., Carter, P. y Booth, I. R.** 1997. Mutations in the glutathione-gated KefC K⁺ efflux system of *Escherichia coli* that cause constitutive activation. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 24942-24947.
- Misson, J., Raghobama, K. G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M. A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., Doumas, P., Nacry, P., Herrerra-Estrella, L., Nussaume, L. y Thibaud, M. C.** 2005. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to

- phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 11934-9.
- Mittler, R.** 2017. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22, 11-19.
- Mockaitis, K. y Howell, S. H.** 2000. Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of Arabidopsis seedlings. *Plant Journal*, 24, 785-96.
- Moller, I. S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G. M., Roy, S. J., Coates, J. C., Haseloff, J. y Tester, M.** 2009. Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21, 2163-2178.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., Mccue, K., Schaeffer, L. y Wold, B.** 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5, 621-628.
- Mumberg, D., Müller, R. y Funk, M.** 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156, 119-122.
- Munns, R.** 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167, 645-663.
- Munns, R., James, R. A., Xu, B., Athman, A., Conn, S. J., Jordans, C., Byrt, C. S., Hare, R. A., Tyerman, S. D., Tester, M., Plett, D. y Gilliam, M.** 2012. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology*, 30, 360-4.
- Munns, R. y Tester, M.** 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Nagao, S., Kanamori, M., Ochiai, S., Tomihara, S., Fukushi, K. y Yamamoto, M.** 2013. Export of ¹³⁴Cs and ¹³⁷Cs in the Fukushima river systems at heavy rains by Typhoon Roke in september 2011. *Biogeosciences*, 10, 6215-6223.
- Nakamura, T., Fujisaki, Y., Enomoto, H., Nakayama, Y., Takabe, T., Yamaguchi, N. y Uozumi, N.** 2001. Residue aspartate-147 from the third transmembrane region of Na⁺/H⁺ antiporter NhaB of *Vibrio alginolyticus* plays a role in its activity. *Journal of Bacteriology*, 183, 5762-5767.
- Naso, A., Dreyer, I., Pedemonte, L., Testa, I., Gomez-Porras, J. L., Usai, C., Mueller-Rueber, B., Diaspro, A., Gambale, F. y Picco, C.** 2009. The role of the C-terminus for functional heteromerization of the plant channel KDC1. *Biophysical Journal*, 96, 4063-74.
- Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Martinez, V. y Rubio, F.** 2010. The Arabidopsis thaliana HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Molecular Plant*, 3, 326-333.
- Nieves-Cordones, M., Caballero, F., Martínez, V. y Rubio, F.** 2012. Disruption of the Arabidopsis thaliana inward-rectifier K⁺ channel AKT1 improves plant responses to water stress. *Plant and Cell Physiology*, 53, 423-432.
- Nieves-Cordones, M., Martinez-Cordero, M. A., Martinez, V. y Rubio, F.** 2007. An NH₄⁺-sensitive component dominates high-affinity K⁺ uptake in tomato plants. *Plant Science*, 172, 273-280.
- Nieves-Cordones, M., Miller, A., Alemán, F., Martínez, V. y Rubio, F.** 2008. A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Molecular Biology*, 68, 521-532.
- Nieves-Cordones, M., Mohamed, S., Tanoi, K., Kobayashi, N. I., Takagi, K., Vernet, A., Guiderdoni, E., Périn, C., Sentenac, H. y Véry, A.-A.** 2017. Production of low-Cs⁺ rice plants by inactivation of the K⁺ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. *The Plant Journal*, n/a-n/a.
- Nieves-Cordones, M., Rodenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R. M., Martinez, V., Gaillard, I. y Rubio, F.** 2016. Uneven HAK/KUP/KT protein diversity among angiosperms: species distribution and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 7.

- Nikiforova, V., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H. y Hoefgen, R. 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant Journal*, 33, 633-50.
- Nolen, B., Taylor, S. y Ghosh, G. 2004. Regulation of protein kinases: Controlling activity through activation segment conformation. *Molecular Cell*, 15, 661-675.
- Núñez-Ramírez, R., Sanchez-Barrena, M. J., Villalta, I., Vega, J., Pardo, J., Quintero, F., Martínez-Salazar, J. y Albert, A. 2012. Structural insights on the plant salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) Na⁺/H⁺ antiporter. *Journal of Molecular Biology*, 424, 283-94.
- O'donnell, V. B., Tew, D. G., Jones, O. T. G. y England, P. J. 1993. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochemical Journal*, 290, 41-49.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U. y Zhu, J. K. 2003. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C AB12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 11771-11776.
- Oliferuk, S., Ródenas, R., Pérez, A., Martínez, V., Rubio, F. y Santa-María, G. E. 2017. DELLAs contribute to set the growth and mineral composition of *Arabidopsis thaliana* plants grown under conditions of potassium deprivation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 487-501.
- Oomen, R. J. F. J., Benito, B., Sentenac, H., Rodriguez-Navarro, A., Talon, M., Very, A.-A. y Domingo, C. 2012. HKT2;2/1, a K⁺-permeable transporter identified in a salt-tolerant rice cultivar through surveys of natural genetic polymorphism. *Plant Journal*, 71, 750-762.
- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., Ohiraki, H., Yamada, K., Seo, S.-U., Abo, M., Yoshimura, E., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2013. Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*.
- Otttschysch, N., Raes, A. L., Van Hoorick, D. y Snyders, D. J. 2002. Obligatory heterotetramerization of novel Kv channel subunits promotes trafficking out of the ER. *Biophysical Journal*, 82, 254A-254A.
- Page, D. R. y Grossniklaus, U. 2002. The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 3, 124-136.
- Pandey, G., Kanwar, P. y Pandey, A. 2014. *Global Comparative Analysis of CBL-CIPK Gene families in plants*, Springer International Publishing.
- Pandey, G. K., Cheong, Y. H., Kim, B. G., Grant, J. J., Li, L. G. y Luan, S. 2007. CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis*. *Cell Research*, 17, 411-421.
- Park, J., Kim, Y.-Y., Martinoia, E. y Lee, Y. 2008. Long-distance transporters of inorganic nutrients in plants. *Journal of Plant Biology*, 51, 240-247.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T. y Salzberg, S. L. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33, 290-+.
- Philippar, K., Fuchs, I., Luthen, H., Hoth, S., Bauer, C. S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Bottger, M., Becker, D. y Hedrich, R. 1999. Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 12186-12191.
- Piao, H. L., Xuan, Y. H., Park, S. H., Je, B. I., Park, S. J., Park, S. H., Kim, C. M., Huang, J., Wang, G. K., Kim, M. J., Kang, S. M., Lee, I. J., Kwon, T. R., Kim, Y. H., Yeo, U. S., Yi, G., Son, D. y Han, C. D. 2010. OsCIPK31, a CBL-interacting protein kinase is involved in germination and seedling growth under abiotic stress conditions in rice plants. *Molecules and Cells*, 30, 19-27.

- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Cherel, I. y Sentenac, H.** 2003a. Regulated expression of Arabidopsis Shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Molecular Biology*, 51, 773-787.
- Pilot, G., Pratelli, R., Gaymard, F., Meyer, Y. y Sentenac, H.** 2003b. Five-group distribution of the Shaker-like K⁺ channel family in higher plants. *Journal of Molecular Evolution*, 56, 418-34.
- Poirier, Y., Thoma, S., Somerville, C. y Schiefelbein, J.** 1991. Mutant of Arabidopsis deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiology*, 97, 1087-93.
- Pottosin, I., Wherrett, T. y Shabala, S.** 2009. SV channels dominate the vacuolar Ca²⁺ release during intracellular signaling. *FEBS Letters*, 583, 921-926.
- Prosser, I. M., Purves, J. V., Saker, L. R. y Clarkson, D. T.** 2001. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany*, 52, 113-121.
- Pyo, Y. J., Gierth, M., Schroeder, J. I. y Cho, M. H.** 2010. High-affinity K⁺ transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 are vital for seedling establishment and postgermination growth under low-potassium conditions. *Plant Physiology*, 153, 863-875.
- Qi, Z., Hampton, C. R., Shin, R., Barkla, B. J., White, P. J. y Schachtman, D. P.** 2008. The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 59, 595-607.
- Qin, Y. Z., Li, X., Guo, M., Deng, K. Q., Lin, J. Z., Tang, D. Y., Guo, X. H. y Liu, X. M.** 2008. Regulation of salt and ABDA responses by CIPK14, a calcium sensor interacting protein kinase in Arabidopsis. *Science in China Series C-Life Sciences*, 51, 391-401.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J. M. y Guo, Y.** 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress. *Plant Cell*, 19, 1415-31.
- Quintero, F. J. y Blatt, M. R.** 1997. A new family of K⁺ transporters from Arabidopsis that are conserved across phyla. *FEBS Letters*, 415, 206-11.
- Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J. K. y Pardo, J. M.** 2002. Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 9061-9066.
- Ranf, S., Wunnenberg, P., Lee, J., Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R., Scheel, D. y Dietrich, P.** 2008. Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺ signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant Journal*, 53, 287-299.
- Reddy, A. S. N.** 2001. Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Science*, 160, 381-404.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K. y Hedrich, R.** 2002. AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel alpha-subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 4079-4084.
- Ren, D. T., Yang, H. P. y Zhang, S. Q.** 2002. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 559-565.
- Ren, X.-L., Qi, G.-N., Feng, H.-Q., Zhao, S., Zhao, S.-S., Wang, Y. y Wu, W.-H.** 2013. Calcineurin B-like protein CBL10 directly interacts with AKT1 and modulates K⁺ homeostasis in Arabidopsis. *Plant Journal*, 74, 258-266.
- Ren, Z. H., Gao, J. P., Li, L. G., Cai, X. L., Huang, W., Chao, D. Y., Zhu, M. Z., Wang, Z. Y., Luan, S. y Lin, H. X.** 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, 37.
- Rengel, Z. y Damon, P. M.** 2008. Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. *Physiologia Plantarum*, 133, 624-636.

Bibliografía

- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S. y Frommer, W. B.** 1995. NTr1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 370, 264-268.
- Rivetta, A., Allen, K. E., Slayman, C. W. y Slayman, C. L.** 2013. Coordination of K⁺ transporters in neurospora: TRK1 is scarce and constitutive, while HAK1 is abundant and highly regulated. *Eukaryotic Cell*, 12, 684-96.
- Roberts, E. y Kolattukudy, P. E.** 1989. Molecular cloning, nucleotide sequence, and abscisic acid induction of a suberization-associated highly anionic peroxidase. *Molecular Genetics and Genomics*, 217, 223-32.
- Rodríguez-Navarro, A.** 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469, 1-30.
- Rodríguez-Navarro, A., Blatt, M. R. y Slayman, C. L.** 1986. A potassium-proton symport in *Neurospora crassa* *Journal of General Physiology*, 87, 649-674.
- Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J.** 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae* *Journal of Bacteriology*, 159, 940-945.
- Rodríguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E. y Bleecker, A. B.** 1999. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science*, 283, 996-998.
- Römheld, V. y Kirkby, E.** 2010. Research on potassium in agriculture: needs and prospects. *Plant and Soil*, 335, 155-180.
- Roux, B. y Mackinnon, R.** 1999. The cavity and pore helices the KcsA K⁺ channel: Electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science*, 285, 100-102.
- Rubio, F., Alemán, F., Nieves-Cordones, M. y Martínez, V.** 2010. Studies on Arabidopsis *athak5*, *atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K⁺ uptake. *Physiologia Plantarum*, 139, 220-228.
- Rubio, F., Fon, M., Rodenas, R., Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Rivero, R. M. y Martínez, V.** 2014. A low K⁺ signal is required for functional high-affinity K⁺ uptake through HAK5 transporters. *Physiologia Plantarum*, 152, 558-570.
- Rubio, F., Gassmann, W. y Schroeder, J. I.** 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*, 270, 1660-3.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F. y Martínez, V.** 2008. Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations *Physiologia Plantarum*, 134, 598-608.
- Rubio, F., Santa-Maria, G. E. y Rodríguez-Navarro, A.** 2000. Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum*, 109, 34-43.
- Rubio, V., Bustos, R., Irigoyen, M. L., Cardona-Lopez, X., Rojas-Triana, M. y Paz-Ares, J.** 2009. Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Molecular Biology*, 69, 361-373.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. y Scheres, B.** 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99, 463-472.
- Sambrook, J. y Russell, D. W.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Barrena, M. J., Fujii, H., Angulo, I., Martinez-Ripoll, M., Zhu, J. K. y Albert, A.** 2007. The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Molecular Cell*, 26, 427-435.
- Sanchez-Barrena, M. J., Martinez-Ripoll, M. y Albert, A.** 2013. Structural biology of a major signaling network that regulates plant abiotic stress: The CBL-CIPK mediated pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 5734-5749.
- Sanders, D., Brownlee, C. y Harper, J. F.** 1999. Communicating with calcium. *Plant Cell*, 11, 691-706.

- Santa-María, G. E., Rubio, F., Dubcovsky, J. y Rodríguez-Navarro, A.** 1997. The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell*, 9, 2281-2289.
- Sato, Y., Nanatani, K., Hamamoto, S., Shimizu, M., Takahashi, M., Tabuchi-Kobayashi, M., Mizutani, A., Schroeder, J. I., Souma, S. y Uozumi, N.** 2014. Defining membrane spanning domains and crucial membrane-localized acidic amino acid residues for K⁺ transport of a Kup/HAK/KT-type Escherichia coli potassium transporter. *Journal of Biochemistry*, 155, 315-323.
- Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M. C., Hell, R. y Wirtz, M.** 2013. Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochemical Journal*, 451, 145-154.
- Schachtman, D. P. y Schroeder, J. I.** 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 370, 655-8.
- Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Lucas, W. J., Anderson, J. A. y Gaber, R. F.** 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science*, 258, 1654-8.
- Schachtman, D. P. y Shin, R.** 2007. Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 47-69.
- Schleyer, M. y Bakker, E. P.** 1993. Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K⁺-uptake protein kup from Escherichia coli is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *Journal of Bacteriology*, 175, 6925-6931.
- Schonknecht, G., Spoomaker, P., Steinmeyer, R., Bruggeman, L., Ache, P., Dutta, R., Reintanz, B., Godde, M., Hedrich, R. y Palme, K.** 2002. KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. *FEBS Letters*, 511, 28-32.
- Schopfer, P., Plachy, C. y Frahry, G.** 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiology*, 125, 1591-1602.
- Schroeder, J. I., Delhaize, E., Frommer, W. B., Guerinot, M. L., Harrison, M. J., Herrera-Estrella, L., Horie, T., Kochian, L. V., Munns, R., Nishizawa, N. K., Tsay, Y.-F. y Sanders, D.** 2013. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature*, 497, 60-66.
- Schroeder, J. I. y Hagiwara, S.** 1989. Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma-membrane of vicia-faba guard-cells. *Nature*, 338, 427-430.
- Schroeder, J. I., Ward, J. M. y Gassmann, W.** 1994. Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for K⁺ uptake. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23, 441-71.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J. M., Gaymard, F. y Grignon, C.** 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*, 256, 663-5.
- Serrano, R. y Rodríguez-Navarro, A.** 2001. Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 399-404.
- Shabala, S. y Cuin, T. A.** 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133, 651-669.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T. A., Smith, S. J., Miller, A. J., Davies, J. M. y Newman, I. A.** 2006. Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-Induced K⁺ loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. *Plant Physiology*, 141, 1653-1665.
- Shabala, S., Sahabala, L. y Van Volkenburgh, E.** 2003. Effect of calcium on root development and root ion fluxes in salinised barley seedlings. *Functional Plant Biology*, 30, 507-514.

Bibliografía

- Shakeel, S. N., Wang, X. M., Binder, B. M. y Schaller, G. E.** 2013. Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants*, 5.
- Sharma, M. K., Kumar, R., Solanke, A. U., Sharma, R., Tyagi, A. K. y Sharma, A. K.** 2010. Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 284, 455-75.
- Sharma, S., Singh, B. y Manchanda, V. K.** 2015. Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 946-962.
- Sheahan, J. J., Ribeiro-Neto, L. y Sussman, M. R.** 1993a. Cesium-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* *Plant Journal*, 3, 647-656.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H. B., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F. F., Sharon, M., Browse, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A. y Zheng, N.** 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468, 400-U301.
- Shen, M. Q. y Yen, A.** 2009. c-Cbl tyrosine kinase-binding domain mutant G306E abolishes the interaction of c-Cbl with CD38 and fails to promote retinoic acid-induced cell differentiation and G(o) arrest. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 25664-25677.
- Sherman, F.** 1991. Getting started with yeast. *Methods of Enzymology*, 194, 3-21.
- Shigaki, T. y Hirschi, K. D.** 2006. Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants. *Plant Biology*, 8, 419-429.
- Shin, R.** 2011. Transcriptional regulatory components responding to macronutrient limitation. *Journal of Plant Biology*, 54, 286-293.
- Shin, R., Berg, R. H. y Schachtman, D. P.** 2005. Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiology*, 46, 1350-1357.
- Shin, R., Burch, A. Y., Huppert, K. A., Tiwari, S. B., Murphy, A. S., Guilfoyle, T. J. y Schachtman, D. P.** 2007. The *Arabidopsis* transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. *The Plant Cell*, 19, 2440-2453.
- Shin, R. y Schachtman, D. P.** 2004. Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 8827-8832.
- Smekalova, V., Duskocilova, A., Komis, G. y Samaj, J.** 2014. Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances*, 32, 2-11.
- Spalding, E. P., Hirsch, R. E., Lewis, D. R., Qi, Z., Sussman, M. R. y Lewis, B. D.** 1999. Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *Journal of General Physiology*, 113, 909-18.
- Steingrobe, B. y Claassen, N.** 2000. Potassium dynamics in the rhizosphere and K⁺ efficiency of crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 101-106.
- Steinhorst, L. y Kudla, J.** 2013. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiology*, 163, 471-85.
- Steinhorst, L., Mahs, A., Ischebeck, T., Zhang, C. X., Zhang, X. X., Arendt, S., Schultke, S., Heilmann, I. y Kudla, J.** 2015. Vacuolar CBL-CIPK12 Ca²⁺-sensor-kinase complexes are required for polarized pollen tube growth. *Current Biology*, 25, 1475-1482.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. y Farmer, E. E.** 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 12837-12842.
- Straub, T., Ludewig, U. y Neuhaeuser, B.** 2017. The Kinase CIPK23 inhibits ammonium transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 29, 409-422.
- Suelter, C. H.** 1970. Enzymes activated by monovalent cations. *Science*, 168, 789-+.

- Sun, H., Fan, H. J. y Ling, H. Q. 2015. Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato. *BMC Genomics*, 16, 9.
- Sunarpri, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W. Y., Leung, H. Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J. I. y Uozumi, N. 2005. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant Journal*, 44, 928-938.
- Sutter, J. U., Campanoni, P., Tyrrell, M. y Blatt, M. R. 2006. Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the Arabidopsis KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane. *Plant Cell*, 18, 935-954.
- Swarbreck, S., Colaco, R. y Davies, J. 2013. Plant calcium-permeable channels. *Plant Physiology*.
- Szczerba, M. W., Britto, D. T. y Kronzucker, H. J. 2009. K⁺ transport in plants: Physiology and molecular biology. *Journal of Plant Physiology*, 166, 447-466.
- Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Cheng, N. H., Bock, K. W., Conejero, G., Li, X. Y., Twell, D., Ward, J. M. y Hirschi, K. D. 2004. Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K⁺ homeostasis in pollen development. *Plant Physiology*, 136, 2532-2547.
- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., Palme, K. y Hedrich, R. 2001. KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 2917-2921.
- Taiz, L. a. Z., Eduardo Zeiger 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc
- Talke, I. N., Blaudez, D., Maathuis, F. J. M. y Sanders, D. 2003. CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends in Plant Science*, 8, 286-293.
- Tang, R. J., Liu, H., Yang, Y., Yang, L., Gao, X. S., Garcia, V. J., Luan, S. y Zhang, H. X. 2012. Tonoplast calcium sensors CBL2 and CBL3 control plant growth and ion homeostasis through regulating V-ATPase activity in Arabidopsis. *Cell Res*, 22, 1650-1665.
- Tanksley, S. D., Ganai, M. W., Prince, J. P., Devicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., Fulton, T. M., Giovannoni, J. J., Grandillo, S., Martin, G. B., Messeguer, R., Miller, J. C., Miller, L., Paterson, A. H., Pineda, O., Roder, M. S., Wing, R. A., Wu, W. y Young, N. D. 1992. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132, 1141-1160.
- Teale, W. D., Paponov, I. A. y Palme, K. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 847-859.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, F., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L. y Hirt, H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 15, 141-152.
- Tester, M. y Blatt, M. R. 1989. Direct measurement of K⁺ channels in thylakoid membranes by incorporation of vesicles into planar lipid bilayers. *Plant Physiology*, 91, 249-252.
- Tester, M. y Davenport, R. J. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91, 503-527.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. y Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75, 291-295.
- Thirugnanasambantham, K., Durairaj, S., Saravanan, S., Karikalan, K., Muralidaran, S. y Islam, V. I. H. 2015. Role of Ethylene Response Transcription Factor (ERF) and Its regulation in response to stress encountered by Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, 347-357.
- Tholema, N., Vor Der Bruggen, M., Maser, P., Nakamura, T., Schroeder, J. I., Kobayashi, H., Uozumi, N. y Bakker, E. P. 2005. All four putative selectivity filter

- glycine residues in KtrB are essential for high affinity and selective K⁺ uptake by the KtrAB system from *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 41146-41154.
- Thomas, S. G., Phillips, A. L. y Hedden, P.** 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 4698-4703.
- Tiwari, S. B., Hagen, G. y Guilfoyle, T.** 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell*, 15, 533-543.
- Toyomasu, T., Kawaide, H., Sekimoto, H., Vonnumers, C., Phillips, A. L., Hedden, P. y Kamiya, Y.** 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding gibberellin 20-oxidase from rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 99, 111-118.
- Tripp, J., Mishra, S. K. y Scharf, K. D.** 2009. Functional dissection of the cytosolic chaperone network in tomato mesophyll protoplasts. *Plant Cell Environmental*, 32, 123-33.
- Tsay, Y.-F., Ho, C.-H., Chen, H.-Y. y Lin, S.-H.** 2011. Integration of nitrogen and potassium Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 207-226.
- Tsuchisaka, A. y Theologis, A.** 2004. Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the Arabidopsis gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2275-80.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmaki, A., Brosche, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J. I. y Kangasjarvi, J.** 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, 452, 487-491.
- Vallejo, A. J.** 2005. Expression of potassium-transporter coding genes, and kinetics of rubidium uptake, along a longitudinal root axis. *Plant Cell Environmental*, 28, 850-862.
- Van Verk, M. C., Hickman, R., Pieterse, C. M. J. y Van Wees, S. C. M.** 2013. RNA-Seq: revelation of the messengers. *Trends in Plant Science*, 18, 175-179.
- Venema, K., Quintero, F. J., Pardo, J. M. y Donaire, J. P.** 2002. The Arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 2413-2418.
- Véry, A.-A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C. y Sentenac, H.** 2014. Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? *Journal of Plant Physiology*, 171, 748-769.
- Very, A. A. y Sentenac, H.** 2002. Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane. *Trends in Plant Science*, 7, 168-175.
- Very, A. A. y Sentenac, H.** 2003. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 575-603.
- Vicente-Agullo, F., Rigas, S., Desbrosses, G., Dolan, L., Hatzopoulos, P. y Grabov, A.** 2004. Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in Arabidopsis roots. *Plant Journal*, 40, 523-535.
- Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E. y Boeke, J. D.** 1996. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 10315-10320.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benkova, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C. y Friml, J.** 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-independent cross-regulation of PIN expression. *Development*, 132, 4521-4531.

- Vigliocco, A., Bonamico, B., Alemanno, S., Miersch, O. y Abdala, G. A.** 2002. Stimulation of jasmonic acid production in *Zea Mays* L. infected by the maize rough dwarf virus - Rio Cuarto. Reversion of symptoms by salicylic acid. *Biocell*, 26, 369-374.
- Voelker, C., Gomez-Porrás, J. L., Becker, D., Hamamoto, S., Uozumi, N., Gambale, F., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K. y Dreyer, I.** 2010. Roles of tandem-pore K⁺ channels in plants - a puzzle still to be solved. *Plant Biology*, 12, 56-63.
- Volkov, A. G., Paula, S. y Deamer, D. W.** 1997. Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42, 153-160.
- Waadt, R. y Kudla, J.** 2008. In planta visualization of protein interactions using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). *CSH Protocols*, 2008, pdb prot4995.
- Waadt, R., Schlucking, K., Schroeder, J. I. y Kudla, J.** 2014. Protein fragment Bimolecular Fluorescence Complementation analyses for the in vivo study of protein-protein interactions and cellular protein complex localizations. *Arabidopsis Protocols*, 3rd Edition. Totowa: Humana Press Inc.
- Waadt, R., Schmidt, L. K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R. y Kudla, J.** 2008. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *The Plant Journal*, 56, 505-516.
- Walker, D. J., Leigh, R. A. y Miller, A. J.** 1996. Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 10510-10514.
- Walker, R. L., Burns, I. G. y Moorby, J.** 2001. Responses of plant growth rate to nitrogen supply: a comparison of relative addition and N interruption treatments. *Journal of Experimental Botany*, 52, 309-17.
- Wang, C. J., Yamamoto, H., Narumiya, F., Munekage, Y. N., Finazzi, G., Szabo, I. y Shikanai, T.** 2017. Fine-tuned regulation of the K⁺/H⁺ antiporter KEA3 is required to optimize photosynthesis during induction. *Plant Journal*, 89, 540-553.
- Wang, F. F., Cui, X. K., Sun, Y. y Dong, C. H.** 2013. Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Reports*, 32, 1099-1109.
- Wang, J., Hu, Z., Zhao, T., Yang, Y., Chen, T., Yang, M., Yu, W. y Zhang, B.** 2015. Genome-wide analysis of bHLH transcription factor and involvement in the infection by yellow leaf curl virus in tomato (*Solanum lycopersicum*). *BMC Genomics*, 16, 39.
- Wang, K. L., Li, H. y Ecker, J. R.** 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 14 Suppl, S131-51.
- Wang, L., Hua, D. P., He, J. N., Duan, Y., Chen, Z. Z., Hong, X. H. y Gong, Z. Z.** 2011. Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene HB33 mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *Plos Genetics*, 7.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. y Altman, A.** 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Sciences*, 9, 244-52.
- Wang, Y.-H., Garvin, D. F. y Kochian, L. V.** 2002. Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiology*, 130, 1361-1370.
- Wang, Y., He, L., Li, H. D., Xu, J. A. y Wu, W. H.** 2010. Potassium channel alpha-subunit AtKC1 negatively regulates AKT1-mediated K⁺ uptake in *Arabidopsis* roots under low-K⁺ stress. *Cell Research*, 20, 826-837.
- Wang, Y. y Wu, W.-H.** 2010. Plant sensing and signaling in response to K⁺-deficiency. *Molecular Plant*, 3, 280-287.
- Wang, Y. y Wu, W.-H.** 2013. Potassium transport and signaling in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 451-476.
- Wang, Y. H., Garvin, D. F. y Kochian, L. V.** 2002. Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in

- tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiology*, 130, 1361-1370.
- Weinl, S. y Kudla** 2009. The CBL-CIPK Ca²⁺-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist*, 184, 517-528.
- White, P. J. y Broadley, M. R.** 2000. Mechanisms of caesium uptake by plants. *New Phytologist*, 147, 241-256.
- White, P. J. y Karley, A. J.** 2010. Potassium. *Cell Biology of Metals and Nutrients*. Heidelberg: Springer.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P. B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquie, D., Benkova, E., Scheres, B. y Friml, J.** 2006. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312, 883-883.
- Wu, J., Wang, J., Pan, C., Guan, X., Wang, Y., Liu, S., He, Y., Chen, J., Chen, L. y Lu, G.** 2014. Genome-Wide Identification of MAPKK and MAPKKK gene families in tomato and transcriptional profiling analysis during development and stress response. *PLoS ONE*, 9, e103032.
- Xicluna, J. R. M., Lacombe, B. T., Dreyer, I., Alcon, C., Jeanguenin, L., Sentenac, H., Thibaud, J.-B. y Chérel, I.** 2007. Increased functional diversity of plant K⁺ channels by preferential heteromerization of the Shaker-like Subunits AKT2 and KAT2. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 486-494.
- Xing, S. P., Wallmeroth, N., Berendzen, K. W. y Grefen, C.** 2016. Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo. *Plant Physiology*, 171, 727-758.
- Xing, Y., Jia, W. S. y Zhang, J. H.** 2007. AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2969-2981.
- Xu, J., Li, H. D., Chen, L. Q., Wang, Y., Liu, L. L., He, L. y Wu, W. H.** 2006. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell*, 125, 1347-1360.
- Xu, K., Chen, S., Li, T., Ma, X., Liang, X., Ding, X., Liu, H. y Luo, L.** 2015. OsGRAS23, a rice GRAS transcription factor gene, is involved in drought stress response through regulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biology*, 15, 141.
- Yan, J. B., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z. Y., Zhang, W. G., Qi, T. C., Cheng, Z. W., Peng, W., Luo, H. B., Nan, F. J., Wang, Z. y Xie, D. X.** 2009. The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell*, 21, 2220-2236.
- Yan, J. L., Niu, F. F., Liu, W. Z., Zhang, H. F., Wang, B. Y., Yang, B. y Jiang, Y. Q.** 2014. Arabidopsis CIPK14 positively regulates glucose response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450, 1679-1683.
- Yang, J., Tian, L., Sun, M. X., Huang, X. Y., Zhu, J., Guan, Y. F., Jia, Q. S. y Yang, Z. N.** 2013. AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for pollen wall pattern formation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 162, 720-731.
- Yang, T., Zhang, S., Hu, Y., Wu, F., Hu, Q., Chen, G., Cai, J., Wu, T., Moran, N., Yu, L. y Xu, G.** 2014. The Role of a potassium transporter OshAK5 in potassium acquisition and transport from roots to shoots in rice at low potassium supply levels. *Plant Physiology*, 166, 945-959.
- Yano, K., Aoki, K. y Shibata, D.** 2007. Genomic Databases for Tomato. *Plant Biotechnology*, 24, 17-25.
- Yao, X., Horie, T., Xue, S., Leung, H.-Y., Katsuhara, M., Brodsky, D. E., Wu, Y. y Schroeder, J. I.** 2010. Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OshKT2;1 and OshKT2;2 transporters in plant cells. *Plant Physiology*, 152, 341-355.
- Yasuda, S., Aoyama, S., Hasegawa, Y., Sato, T. y Yamaguchi, J.** 2017. Arabidopsis CBL-Interacting Protein Kinases regulate carbon/nitrogen-nutrient response by phosphorylating ubiquitin ligase ATL31. *Molecular Plant*, 10, 605-618.

- Yasutaka, T., Miyoshi, H. y Ito, K.** 2014. Transfer of radiocesium from hydroponic medium to potherb mustard and tomato plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 60, 818-823.
- Yuan, F., Yang, H. M., Xue, Y., Kong, D. D., Ye, R., Li, C. J., Zhang, J. Y., Theprungsirikul, L., Shrift, T., Krichilsky, B., Johnson, D. M., Swift, G. B., He, Y. K., Siedow, J. N. y Pei, Z. M.** 2014. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in Arabidopsis. *Nature*, 514, 367-+.
- Yuasa, T., Ishibashi, Y. y Iwaya-Inoue, M.** 2012. A Flower Specific Calcineurin B-Like Molecule (CBL)-Interacting Protein Kinase (CIPK) homolog in tomato cultivar Micro-Tom (*Solanum lycopersicum*, L.). *American Journal of Plant Sciences*, Vol.03No.06, 11.
- Zanetti, M., Teardo, E., La Rocca, N., Zulkifli, L., Checchetto, V., Shijuku, T., Sato, Y., Giacometti, G. M., Uozumi, N., Bergantino, E. y Szabo, I.** 2010. A novel potassium channel in photosynthetic cyanobacteria. *PLoS ONE*, 5, 10.
- Zhang, B., Karnik, R., Wang, Y., Wallmeroth, N., Blatt, M. R. y Grefen, C.** 2015. The Arabidopsis R-SNARE VAMP721 interacts with KAT1 and KC1 K⁺ channels to moderate K⁺ current at the plasma membrane. *Plant Cell*, 27, 1697-1717.
- Zhang, H. C., Yin, W. L. y Xia, X. L.** 2008. Calcineurin B-Like family in Populus: comparative genome analysis and expression pattern under cold, drought and salt stress treatment. *Plant Growth Regulation*, 56, 129-140.
- Zhao, D. L., Oosterhuis, D. M. y Bednarz, C. W.** 2001. Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. *Photosynthetica*, 39, 103-109.
- Zhao, J., Cheng, N. H., Motes, C. M., Blancaflor, E. B., Moore, M., Gonzales, N., Padmanaban, S., Sze, H., Ward, J. M. y Hirschi, K. D.** 2008. AtCHX13 is a plasma membrane K⁺ transporter. *Plant Physiology*, 148, 796-807.
- Zhao, S., Zhang, M.-L., Ma, T.-L. y Wang, Y.** 2016. Phosphorylation of ARF2 relieves its repression of transcription of the K⁺ transporter gene HAK5 in response to low potassium stress. *The Plant Cell*, 28, 3005-3019
- Zhu, J. K.** 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using arabidopsis. *Plant Physiology*, 124, 941-948.
- Zhu, J. K.** 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167, 313-324.
- Zielinski, R. E.** 1998. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 697-725.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. y Gruissem, W.** 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*, 136, 2621-32.
- Zimmermann, S. y Sentenac, H.** 1999. Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 477-482.

