

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología



**Identificación de mutantes de *Arabidopsis thaliana*
resistentes a norespermidina.
Clonación y caracterización de una sulfidril
oxidasa.**

Memoria del trabajo de Tesis Doctoral presentada por

Santiago Alejandro Martínez

para optar al título de

Doctor en Biotecnología

Director:

Dr. Ramón Serrano Salom

Co-director:

Dr. Pedro L. Rodríguez Egea

Valencia, 2007

Agradecimientos

Quisiera mencionar en primer lugar a Ramón Serrano por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio, le estoy muy agradecido por la confianza que depositó en mí y por dirigir de una manera adecuada y acertada mi trabajo en el laboratorio.

También quiero dar las gracias a Mariche por su disposición a ayudar a todos los miembros del laboratorio, incluido a mí, además de estar siempre dispuesta a escuchar cuando alguien del laboratorio tiene dudas o problemas, incluido yo mismo.

A Pedro Rodríguez quiero agradecerle su apoyo en mis primeros contactos con la biología molecular, sus consejos científicos y su ayuda en mis múltiples problemas con la fisiología de *Arabidopsis*, además de su interés y ayuda en la realización de esta tesis.

Después de más de 7 años en el instituto han sido muchas las personas a las quiero agradecer su apoyo, ayuda y amistad, algunas aún continúan en el instituto, otras ya no están. Los que ya no continuáis en el instituto como Baltasar, Carlos “el alumno”, Kasia, Guido, Silke, Stephanie, Frank, Roc, Antonio, Rodolphe, Pedro, Miguel, Samuela, Vanesa, Khalid, Krzysztof, Huw, Sukesh, Santi, Cristian, Jacobo, Anjuman, Jordi, James, Sergio, Nadezda, espero que en algún momento leáis esta tesis y sepáis que he aprendido mucho de vosotros.

A la gente que continua Eduardo, Lola, JM, Guillem, Angela, Lynne, Silvia R, Beatriz, Rosa, Gaetano, Rosi, Cinta, Silvia L, Americo, Julia, Markus, Mauricio, Joserra, Fernando, Jorge, Payo, Mar, Jessica, les agradezco que siempre estuvieran dispuestos a echarme una mano cuando la necesitaba.

A gente de otros laboratorios y servicios, Diego, Pedro, Douglas, Emilio, Vasile, Vasil, Astrid, Pablo, Barto, Capa, Nacho, Carolina, Andrés, al equipo de futbol del IBMCP, por compartir momentos de conversación científico-cultural así como momentos lúdico-festivos.

Agradezco el apoyo de los distintos servicios del IBMCP (secuenciación, microscopía, servicios técnicos, invernadero, administración, informática, almacén, biblioteca) en la realización de esta tesis, que a buen seguro no hubiera podido completarse sin su ayuda.

A toda la gente que en algún u otro momento me ayudó a resolver problemas técnicos y científicos dentro y fuera del IBMCP, son tantos que al nombrarlos podría caer en el error de olvidarme de alguno así que solo les dire esto: gracias.

A las 2 personas a las cuales ayudé con su trabajo de fin de carrera: Natxo, con el que compartí mutantes *par* y partidos de futbol y a quien agradezco su apoyo y espero que termine su doctorado satisfactoriamente. Regina, con la que he compartido pipetas y soluciones, agradezco su ayuda para terminar esta tesis y ojalá consiga finalizar su doctorado sin sobresaltos.

Finalmente, quisiera agradecer a la Fundación Reina Sofía y a la Universidad Politécnica de Valencia por haberme concedido becas para poder llevar a cabo la tesis doctoral.

Resumen

La salinidad es uno de los estreses ambientales que más incide en la productividad agrícola, especialmente en las regiones semiáridas como la zona mediterránea, donde se ubica la Comunidad Valenciana. Para poder mitigar los efectos perjudiciales de los estreses abióticos resulta necesario conocer las bases moleculares de los fenómenos investigados, ya que solo entonces podrán ser manipulados de la manera más conveniente. En el caso de la tolerancia a la salinidad se conocen una serie de aspectos claves que han contribuido a mejorar las plantas cultivadas, pero es necesaria mucha más investigación para poder obtener resultados adecuados para la práctica agrícola.

En este trabajo se ha planteado un nuevo abordaje consistente en el uso de norespermidina, una poliamina no metabolizable, como agente de selección para encontrar individuos resistentes a cationes tóxicos. Para ello se ha utilizado una colección de semillas de *Arabidopsis* mutadas por inserción de un activador transcripcional. Con este abordaje se aisló el mutante *par1-ID* (polyamine resistant) que presenta un fenotipo pleiotrópico de resistencia a cationes tóxicos como Na^+ , Li^+ , norespermidina y espermidina. *par1-ID* es un mutante dominante que presenta un aumento en la expresión del locus At1g15020. Este locus codifica una proteína perteneciente a la familia de las quiescina sulfidril oxidasas (existen 2 proteínas homólogas de esta familia en *Arabidopsis*) por lo que se propuso el nombre de *QSO2* (quiescina sulfidril oxidasas) para denominar al locus At1g15020. Mediante un análisis de RT-PCR en diferentes partes de la planta se encontró que *QSO2* se expresa principalmente en la raíz y el polen, además al expresar de forma transitoria la construcción *QSO2::GFP* en la epidermis de hojas de *N. benthamiana*, la expresión de *QSO2* se localizó en la pared celular. Por otro lado, se expresó y purificó en *S. cerevisiae* la proteína recombinante *QSO2* y se demostró su actividad sulfidril oxidasas. Finalmente, en plántulas y plantas adultas del mutante *par1-ID* (con aumento de la expresión de *QSO2*) se pudo observar una disminución en la acumulación de Na^+ , Li^+ y norespermidina, así como un aumento en la acumulación de K^+ en el xilema y en la parte aérea. Por el contrario, el mutante *par1-2* obtenido por inserción de T-DNA y que presenta una disminución en la expresión de *QSO2*, muestra el fenotipo opuesto a *par1-ID*.

Con estos resultados se propone un posible mecanismo de acción de *QSO2* en la raíz, según el cual *QSO2* actuaría activando un sistema de carga de K^+ en el xilema, diferente al canal SKOR, que no es necesario para la acción de *QSO2*. Esto generaría un aumento del potencial de membrana en la interfase simplasto:xilema, disminuyendo así la entrada de cationes tóxicos en el xilema y su posterior traslocación a la parte aérea. Este trabajo demuestra por primera vez la función de las sulfidril oxidasas como reguladores de la homeostasis iónica y muestra la importancia de la regulación de la carga de cationes al xilema en la tolerancia a cationes tóxicos.

Resum

La salinitat és un dels estressos ambientals que més incideix en la productivitat agrícola, especialment en les regions semiàrides com la zona mediterrània, on es situa la Comunitat Valenciana. Per poder mitigar els efectes perjudicials dels estressos abiòtics cal conèixer les bases moleculars dels fenòmens investigats, ja que sols llavors podran ser manipulats de la manera més convenient. En el cas de la tolerància a la salinitat es coneixen una sèrie d'aspectes claus que han contribuït a millorar les plantes conreades, però és necessària molta més investigació per poder obtenir resultats adequats per la practica agrícola.

En aquest treball s'ha plantejat una nova aproximació consistent en l'ús de noespermidina, una poliamina no metabolizable, com agent de selecció per trobar individus resistents a cations tòxics. Per a això s'ha utilitzat una col·lecció de llavors de *Arabidopsis* mutades per inserció d'un activador transcripcional. En aquesta aproximació es va aïllar el mutant *par1-ID* (polyamine resistant) que presenta un fenotip pleiotròpic de resistència a cations tòxics Na^+ , Li^+ , noespermidina i espermidina. *par1-ID* és un mutant dominant que presenta un augment en l'expressió del locus At1g15020. Aquest locus codifica una proteïna pertanyent a la família de les quiescina sulfidril oxidases (existeixen 2 proteïnes homòlogues d'aquesta família en *Arabidopsis*) pel que es va proposar el nom de QSO2 (quiescina sulfidril oxidasa) per a denominar al locus At1g15020. Mitjançant una anàlisi de RT-PCR en diferents parts de la planta es va trobar que QSO2 s'expressa principalment en l'arrel i el pol·len, a més a l'expressar de forma transitòria la construcció QSO2::GFP en la epidermis de fulles de *N. benthamiana*, l'expressió de QSO2 es va localitzar en la paret cel·lular. D'altra banda, es va expressar i va purificar en *S. cerevisiae* la proteïna recombinant QSO2 i es va demostrar la seva activitat sulfidril oxidasa. Finalment, en plàntules i plantes adultes del mutant *par1-ID* (amb augment en l'expressió de QSO2) es va poder observar una disminució en l'acumulació de Na^+ , Li^+ i noespermidina, així com un augment en l'acumulació de K^+ en el xilema i en la part aèria. Per contra, el mutante *par1-2* obtingut per inserció de T-DNA i que presenta una disminució en l'expressió de QSO2, mostra el fenotip oposat a *par1-ID*.

Amb aquests resultats es proposa un possible mecanisme d'acció de QSO2 en l'arrel, segons el qual QSO2 actuaria activant un sistema de càrrega de K^+ en el xilema, diferent al canal SKOR, que no és necessari per a l'acció de QSO2. Això generaria un augment del potencial de membrana en la interfase simplast:xilema, disminuint així l'entrada de cations tòxics en el xilema i la seua posterior traslocació a la part aèria. Aquest treball demostra per primera vegada la funció de les sulfidril oxidases com reguladors de l'homeòstasi iònica i mostra la importància de la regulació de la càrrega de cations en el xilema en la tolerància a cations tòxics.

Abstract

Salinity is one of the abiotic stresses which most affects crop productivity, especially in semiarid regions like the mediterranean zone where the Valencian Community is located. In order to be able to mitigate the detrimental effects of abiotic stresses it is necessary to know the molecular basis of the plant physiological responses; then these could be manipulated in a sensible way. In the case of salinity tolerance, actually are known a group of key aspects that have contributed to improve the cultivated plants, but more investigation is necessary to be able to obtain results adapted for agricultural practices.

This work proposed a new approach using norspermidine, a non-metabolize polyamine, as selection agent to find *Arabidopsis* lines resistant to toxic cations. A genetic screen of the *Arabidopsis* “activation-tagging” mutant collection based on tolerance to the toxic cation norspermidine resulted in a dominant mutant *par1-ID* (polyamine resistant) with increased expression of the *QSO2* gene (At1g15020), encoding a member of the quiescin-sulphydryl oxidase family. The *par1-ID* mutant plants, and transgenic plants overexpressing *QSO2* cDNA, are more tolerant than wild type *Arabidopsis* to polyamines, Li^+ and Na^+ . This seems to be explained by a decrease in the accumulation of these toxic cations in xylem and shoots. On the other hand, the accumulation of K^+ in xylem and shoots is increased in the *par1-ID* mutant. A loss-of-function mutant of the *QSO2* gene (*par1-2*) exhibits phenotypes opposites to those of *par1-ID* mutant. The *QSO2* gene is mostly expressed in roots and pollen and the predicted QSO2 protein has a signal peptide. Accordingly, a QSO2::GFP fusion expressed in *Nicotiana benthamiana* is localized at the cell surface. The recombinant QSO2 protein expressed in yeast has disulphydryl oxidase activity.

A plausible mechanism for QSO2 action consists of the activation of K^+ loading into the xylem independent of SKOR, which is not necessary to QSO2 function. This would produce an increase in the membrane potential in the interface symplast:xylem, decreasing therefore the toxic cations entrance into xylem and its traslocation to the aerial part. This work demonstrates the function of the sulphydryl oxidases in regulating ionic homeostasis and shows the importance of the regulation of the cation loading into xylem in the tolerance to toxic cations.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

a.k.a.	<u>a</u> lso <u>k</u> nown <u>a</u> s (también conocido como)
aa	<u>a</u> mino <u>á</u> cidos
ABA	<u>A</u> bscisic <u>a</u> cid (Ácido Abscísico)
AcLiTE	<u>A</u> cetato de <u>l</u> itio, <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
ADP	<u>A</u> denosine 5'- <u>d</u> iphosphate (Adenosina 5'-difosfato)
AERO	<u>A</u> rabidopsis <u>E</u> ndoplasmatic <u>R</u> eticulum <u>O</u> xidoreductase (Oxidoreductasa de retículo endoplasmático de <i>Arabidopsis</i>)
AHA	<u>A</u> rabidopsis <u>H</u> ⁺ - <u>A</u> TPase (H^+ -ATPasa de <i>Arabidopsis</i>)
ALR	<u>A</u> ugmenter of <u>L</u> iver <u>R</u> egeneration (Intensificador de la regeneración del hígado)
AMP	<u>A</u> denosine 5'- <u>m</u> onophosphate (Adenosina 5'-monofosfato)
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfate (Persulfato de amonio)
ATP	<u>A</u> denosine 5'- <u>t</u> riphosphate (Adenosina 5'-trifosfato)
BAC	<u>B</u> acterial <u>A</u> rtificial <u>C</u> hromosome (Cromosoma artificial bacteriano)
BAR	<u>B</u> ialaphos <u>R</u> esistance (Resistencia al herbicida Bialaphos o BASTA)
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool (Herramienta de alineamiento de secuencias)
bZIP	<u>B</u> asic Leucine <u>Z</u> ipper <u>D</u> omain (Dominio básico de cremallera de leucinas)
CBL	<u>C</u> alcineurine <u>B</u> -like (Similar a calcineurina B)
cDNA	<u>C</u> omplementary <u>D</u> NA (DNA complementario)
CHX	<u>C</u> ation- <u>H</u> ⁺ <u>E</u> xchanger (Antiportador Cation- H^+)
CIPKs	<u>C</u> BL- <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein <u>K</u> inases (Proteínas quinasa que interaccionan con CBL)
CNGC	<u>C</u> yclic <u>N</u> ucleotide <u>G</u> ated <u>C</u> hannels (Canales activados por nucleótidos cíclicos)
CPA	<u>C</u> ation <u>P</u> roton <u>A</u> ntiporters (Antiportadores catión protón)
CRT	<u>C</u> - <u>r</u> epeat (Elemento regulador en respuesta a frío)
CTAB	Hexadecyltrimethyl <u>A</u> mmonium <u>B</u> romide (Bromuro de cetil trimetilamonio)
CYC	<u>C</u> ytochrome <u>C</u> (Gen de citocromo C)
DNA	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid (Ácido desoxirribonucleico)
DNTB	5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
DREs	<u>D</u> ehydration <u>R</u> esponse <u>E</u> lements (Elementos de respuesta a deshidratación)
DTE	<u>D</u> itioeritritol
DTT	<u>D</u> itiotreitol
EDTA	Ácido <u>e</u> tílen <u>d</u> iamin <u>t</u> etracético
EMS	<u>E</u> til <u>M</u> etano <u>S</u> ulfonato
ER	<u>E</u> ndoplasmatic <u>R</u> eticulum (Retículo endoplasmático)
ERO	<u>E</u> ndoplasmatic <u>R</u> eticulum <u>O</u> xidoreductase (Oxidoreductasa de retículo endoplasmático)
ERV	<u>E</u> ssential for <u>R</u> espiration and <u>V</u> egetative growth (Esencial para la respiración y el crecimiento vegetativo)
EtAcNa	<u>E</u> tanol <u>A</u> cetato de <u>N</u> a ⁺
FAD	<u>F</u> lavina <u>A</u> denina <u>D</u> inucleótido

GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein (Proteína verde fluorescente)
GTED	<u>G</u> lycerol, <u>T</u> ris, <u>E</u> DTA, <u>D</u> TT (Tampón de extracción de proteínas con los componentes indicados)
GUS	β - <u>g</u> lucuronidase (β -glucuronidasa)
HA	<u>H</u> emaglutinina
HAK	<u>H</u> igh- <u>A</u> ffinity <u>K</u> ⁺ (Transportadores de alta afinidad de K ⁺)
HAL	<u>H</u> alotolerancia
HKT	<u>H</u> igh <u>K</u> ⁺ <u>T</u> ransporter (Transportador de K ⁺ de alta afinidad)
HPT II	<u>H</u> ygromycin <u>P</u> hosphotransferase <u>I</u> I (Gen de higromicina fosfotransferasa II)
IP3	<u>I</u> nositol 1,4,5 tri <u>P</u> hosphate (Inositol 1,4,5 trifosfato)
ISAAA	<u>I</u> nternational <u>S</u> ervice for the <u>A</u> cquisition of <u>A</u> gri-Biotech <u>A</u> pplications
kb	<u>K</u> ilobases
KCO	<u>K</u> ⁺ <u>C</u> hannel <u>O</u> utward Rectifying (Canal rectificador de salida de K ⁺)
KEA	<u>K</u> ⁺ <u>E</u> fflux <u>A</u> ntiporter (Antiportador de salida de K ⁺)
KUP	<u>K</u> ⁺ <u>U</u> ptake (Sistema de toma de K ⁺)
LB	<u>L</u> eft <u>B</u> order (Borde izquierdo del T-DNA)
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani (Medio rico para crecer bacterias)
LEU	<u>L</u> eucina
LP	<u>L</u> eft <u>P</u> rimer (Cebador izquierdo)
LSB	<u>L</u> aemmli <u>S</u> ample <u>B</u> uffer (Tampón de carga de proteínas)
M-MuLV	<u>M</u> oloney <u>M</u> urine <u>L</u> eukemia <u>V</u> irus (Virus de la leucemia murina de Moloney)
MAE	<u>M</u> OPS, acetato de sodio <u>E</u> DTA (Tampón de electroforesis de RNA)
MAPK	<u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase (Proteína quinasa activada en la mitosis)
MAPKKK	<u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>K</u> inase <u>K</u> inase
MAS	<u>M</u> anopine <u>S</u> ynthase (Gen de manopina sintasa)
MES	Ácido 2-(N- <u>m</u> orfolino) <u>e</u> tano <u>s</u> ulfónico
MOPS	Ácido 2-(N- <u>m</u> orfolino) <u>p</u> ropano <u>s</u> ulfónico
mRNA	<u>M</u> essenger <u>R</u> NA (RNA mensajero)
MS	<u>M</u> urashige- <u>S</u> koog (Sales del medio de cultivo <i>in vitro</i> de Murashige Skoog)
MYBRs	<u>M</u> YB <u>R</u> ecognition <u>S</u> equence (Secuencia de reconocimiento de MYB)
MYCRs	<u>M</u> YC <u>R</u> ecognition <u>S</u> equence (Secuencia de reconocimiento de MYC)
NASC	The European <i>Arabidopsis</i> Stock Centre (Nottingham)
NHX	<u>N</u> a ⁺ / <u>H</u> ⁺ <u>E</u> xchanger (Antiportador Na ⁺ /H ⁺)
NPT II	<u>N</u> eomycin <u>P</u> hosphotransferase <u>I</u> I (Gen de neomicina fosfotransferasa II)
NSCCs	<u>N</u> on- <u>S</u> elective <u>C</u> ation <u>C</u> hannels (Canales de cationes no selectivos)
OLB	<u>O</u> ligo <u>L</u> abeling <u>B</u> uffer (Tampón de marcaje de sondas con cebadores de oligonucleótidos)
PAGE	<u>P</u> olyacrylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida)
PCI	<u>P</u> henol: <u>C</u> hloroform: <u>I</u> soamyl alcohol (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico)
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDI	<u>P</u> rotein <u>D</u> isulfide <u>I</u> somerase (Proteína disulfuro isomerasa)

PEG	<u>P</u> olietilenglicol
PGK	3'- <u>p</u> hosphoglycerate <u>k</u> inase (Gen de 3'-fosfoglicerato quinasa)
PI	<u>P</u> hosphatidylinositol (Fosfatidilinositol)
PKA	<u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>A</u> (Proteína quinasa A)
PMA	<u>P</u> lasma <u>M</u> embrane <u>A</u> TPase (Gen de ATPasa de membrana plasmática)
PP_i	Phyrophosphate (Pirofosfato)
PSE	Na ₂ HPO ₄ <u>S</u> DS <u>E</u> DTA (Tampón de hibridación de ácidos nucleicos)
PVP	<u>P</u> olyvinil- <u>P</u> yrrolidone (Polivinilpirrolidona)
QSO	<u>Q</u> uiescin <u>S</u> ulphydryl <u>O</u> xidase (Quiescina sulfidril oxidasa)
RB	<u>R</u> ight <u>B</u> order (Borde derecho del T-DNA)
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid (Ácido ribonucleico)
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xigen <u>S</u> pecies (Especies reactivas de oxígeno)
RP	<u>R</u> ight <u>P</u> rimer (Cebador derecho)
rpm	<u>R</u> evoluciones <u>p</u> or <u>m</u> inuto
rRNA	<u>R</u> ibosomal <u>R</u> NA (RNA ribosomal)
RT-PCR	<u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>P</u> CR (PCR en tiempo real)
SD	<u>S</u> ynthetic <u>D</u> efined (Medio mínimo con oligoelementos, vitaminas y sales minerales)
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate (Dodecil sulfato de sodio)
SIGNAL	<u>S</u> alk <u>I</u> nstitute <u>G</u> enomic <u>A</u> nalysis <u>L</u> aboratory
sos	<u>s</u> alt <u>o</u> verly <u>s</u> ensitive (Hipersensible a sal)
SSC	<u>S</u> aline <u>S</u> odium <u>C</u> itrate (Tampón salino de citrato de sodio)
ssDNA	<u>S</u> almon <u>S</u> perm <u>D</u> NA (DNA de esperma de salmón)
STET	<u>S</u> acarosa, <u>T</u> ris, <u>E</u> DTA, <u>T</u> ritón (Tampón para minipreparaciones de plásmidos)
T-DNA	<u>T</u> ransferred <u>D</u> NA (DNA transferido del plasmido T _i de <i>Agrobacterium</i>)
T_m	Melting temperature (Temperatura de anillamineto de híbridos de ácidos nucleicos)
TAIR	<u>T</u> he <u>A</u> rabidopsis <u>I</u> nformation <u>R</u> esource
TAE	<u>T</u> ris Base, ácido <u>a</u> cético, <u>E</u> DTA (Tampón de electroforesis de ácidos nucleicos)
TBE	<u>T</u> ris Base, ácido <u>b</u> órico, <u>E</u> DTA (Tampón de electroforesis de DNA)
TBS	<u>T</u> ris <u>B</u> uffer <u>S</u> aline (Tampón salino para incubaciones con anticuerpo)
TCES	<u>T</u> ris, Na <u>C</u> l, <u>E</u> DTA, <u>S</u> DS (Tamón de extracción de RNA)
TEMED	N,N,N,N'- <u>t</u> etrametilnediamina
TIGR	<u>T</u> he <u>I</u> nstitute for <u>G</u> enomic <u>R</u> esearch
TMS	<u>T</u> ransmembrane <u>S</u> egments (Segmentos transmembrana)
TPK	<u>T</u> andem- <u>P</u> ore <u>K</u> ⁺ Channels (Canales de 2 poros de K ⁺)
TRX	<u>T</u> ioredo <u>x</u> ina
URA	<u>U</u> racilo
upr	<u>U</u> nknow <u>P</u> rotein (Proteína desconocida)
UTR	<u>U</u> ntranslated <u>R</u> egion (Región no codificante)
YNB	<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase
YPD	<u>Y</u> east <u>E</u> xtract, <u>P</u> eptone, <u>D</u> extrose (Medio rico de crecimiento de levaduras)

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Mejora vegetal de cultivos alimenticios	3
1.1.1 Importancia de la mejora vegetal.....	3
1.1.2 La biotecnología como herramienta para la mejora vegetal.....	6
1.2 El problema de la salinidad	10
1.2.1 Antecedentes históricos y estado actual del problema.....	10
1.2.2 Definición de suelo salino.....	12
1.2.3 Causas de la salinidad.....	13
1.3 La salinidad y el desarrollo vegetal	14
1.3.1 Glicofitas <i>versus</i> halofitas.....	14
1.3.2 Efectos causados por la salinidad en las plantas.....	17
1.4 Mecanismos de adaptación al estrés salino	24
1.4.1 Exclusión e inclusión de iones tóxicos.....	24
1.4.2 Flujo a través de la membrana plasmática y compartimentación de iones tóxicos.....	25
1.4.3 Regulación de la distribución de Na ⁺ y Cl ⁻ en la parte aérea.....	29
1.4.4 Moléculas, sensores y vías de señalización que regulan la homeostasis iónica.....	31
1.4.5 Producción de osmolitos.....	35
1.4.6 Respuesta antioxidante en condiciones de estrés salino.....	36
1.5 El empleo de sistemas modelo en biología molecular	37
1.5.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo.....	38
1.5.2 Uso de <i>A. thaliana</i> en estudios de estrés salino.....	38
1.5.3 Estrategias para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a estrés salino en <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
1.5.4 Activación transcripcional en <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
1.6 Policones como herramientas para dilucidar los mecanismos de la tolerancia a estrés salino	42

1.7 Sistemas de transporte de iones a través de las membranas vegetales	44
1.7.1 Transporte pasivo de iones.....	46
1.7.2 Transporte activo de iones.....	47
1.8 Mecanismos de transporte de potasio	48
1.8.1 Canales de K ⁺	49
1.8.2 Transportadores de K ⁺	54
1.9 Regulación de la toma y transporte de K⁺ en la planta	57
1.9.1 Factores que regulan el transporte de K ⁺ en la planta.....	58
1.10 Toma de iones en la raíz: Transporte a corta distancia	67
1.10.1 Transporte radial de iones a través de la raíz.....	68
1.10.2 Liberación de iones en el xilema.....	69
1.11 Plegamiento de proteínas y familia de las sulfidril oxidasas	70
1.11.1 Familia de las sulfidril oxidasas.....	72
1.11.2 Familia de sulfidril oxidasas QSOX.....	74
2. OBJETIVOS	81
3. MATERIALES Y MÉTODOS	85
3.1 Material biológico	87
3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
3.1.2 <i>Nicotiana benthamiana</i>	89
3.1.3 <i>Escherichia coli</i>	89
3.1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
3.1.5 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	89
3.1.6 Vectores de clonación y transformación.....	90
3.2 Medios de cultivo y solución nutritiva	93
3.2.1 Medios para crecimiento de <i>Arabidopsis</i>	93
3.2.2 Medios para crecimiento de bacterias.....	93
3.2.3 Medios para crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	94
3.2.4 Solución nutritiva.....	94

3.3 Manipulación y crecimiento de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	95
3.4 Manipulación y condiciones de crecimiento de <i>E. coli</i>	95
3.4.1 Preparación de células competentes.....	95
3.4.2 Transformación de células competentes.....	96
3.5 Manipulación y condiciones de crecimiento de <i>A. tumefaciens</i>	96
3.5.1 Preparación de células competentes.....	97
3.5.2 Transformación mediante electroporación.....	97
3.6 Manipulación y condiciones de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	97
3.6.1 Preparación de células competentes.....	97
3.6.2 Transformación por choque térmico.....	98
3.7 Búsqueda y análisis de mutantes	98
3.7.1 Rastreo de líneas de <i>A. thaliana</i>	98
3.7.2 Comprobación de la presencia de T-DNA.....	98
3.7.3 Análisis genético.....	99
3.7.4 Análisis de cosegregación.....	100
3.7.5 Rescate plasmídico.....	100
3.8 Ensayo de aparición de cotiledones	101
3.9 Ensayos de crecimiento en invernadero	101
3.10 Ensayos de peso fresco	101
3.11 Ensayo de toma y acumulación de cationes y norespermidina	101
3.11.1 Potasio, sodio, litio y norespermidina.....	101
3.11.2 Rubidio.....	102
3.12 Ensayo de acumulación de iones en el xilema	103
3.13 Medida de cationes y norespermidina	103
3.13.1 Cationes.....	103
3.13.2 Norespermidina.....	103

3.14 Medida del potencial de membrana	104
3.15 Purificación y análisis de ácidos nucleicos	105
3.15.1 Aislamiento de DNA plasmídico.....	105
3.15.2 Aislamiento de DNA genómico de <i>Arabidopsis</i>	106
3.15.3 Electroforesis de DNA.....	106
3.15.4 Análisis “Southern blot”.....	107
3.15.5 Aislamiento de RNA de <i>Arabidopsis</i>	108
3.15.6 Electroforesis de RNA.....	108
3.15.7 Análisis “Northern blot”.....	109
3.15.8 Marcaje radioactivo de sondas.....	109
3.16 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	110
3.16.1 Oligonucleótidos cebadores.....	110
3.16.2 Condiciones de PCR.....	110
3.16.3 PCR diagnóstica.....	111
3.16.4 RT-PCR cuantitativa.....	111
3.17 Construcción de plantas transgénicas	112
3.17.1 Transformación de <i>A. thaliana</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	112
3.17.2 Selección de líneas transgénicas.....	113
3.18 Transformación transitoria de <i>N. benthamiana</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	113
3.19 Ensayo de coexpresión en <i>S. cerevisiae</i>	114
3.20 Preparación y análisis de proteínas	114
3.20.1 Preparación de extracto crudo de proteínas de <i>A. thaliana</i>	114
3.20.2 Preparación de extractos de proteínas soluble e insoluble de <i>S. cerevisiae</i>	115
3.20.3 Preparación de extractos de proteínas extra e intracelular de <i>S. cerevisiae</i>	116
3.20.4 Preparación y purificación de proteína recombinante.....	116
3.20.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE).....	117
3.20.6 Análisis “Western Blot”.....	117

3.21 Ensayos enzimáticos	119
3.21.1 Medida de la actividad H ⁺ -ATPasa.....	119
3.21.2 Ensayo de la actividad sulfidril oxidasa.....	119
4. RESULTADOS	121
4.1 Rastreo de líneas de inserción de T-DNA	123
4.1.1 Condiciones de búsqueda.....	123
4.1.2 Aislamiento de mutantes resistentes a norespermidina.....	124
4.1.3 Determinación del número de inserciones de T-DNA.....	126
4.2 Análisis genético del mutante <i>par1</i>	127
4.2.1 Localización de la inserción de T-DNA en el genoma de <i>Arabidopsis</i> mediante rescate plasmídico.....	127
4.2.2 Estudios de segregación.....	127
4.2.3 Análisis de cosegregación.....	129
4.2.4 Análisis de expresión de genes adyacentes a la inserción de T-DNA en el mutante <i>par1</i>	129
4.2.5 Identificación de nuevos alelos mutantes en el <i>locus</i> At1g15020.....	132
4.2.6 Expresión del <i>locus</i> At1g15020 en los alelos mutantes.....	132
4.3 Caracterización fenotípica de los alelos <i>par1</i>	133
4.3.1 <i>par1-1D</i> presenta un fenotipo pleiotrópico de tolerancia a cationes tóxicos.....	133
4.3.2 <i>par1-2</i> , <i>par1-3</i> y <i>par1-4</i> son sensibles a cationes tóxicos.....	138
4.3.3 <i>par1-1D</i> presenta una menor toma y acumula menor cantidad de cationes tóxicos en condiciones de estrés.....	140
4.3.4 La acumulación y toma de K ⁺ varía en los alelos <i>par1</i>	143
4.3.5 El potencial de membrana de la epidermis radicular no está afectado en los alelos <i>par1</i>	144
4.3.6 Los alelos <i>par1</i> están afectados en la acumulación de cationes en la parte aérea.....	144
4.3.7 Los alelos <i>par1</i> están afectados en la acumulación de cationes en el xilema.....	147

4.4 La sobreexpresión del locus At1g15020 reproduce el fenotipo del mutante <i>par1-1D</i>.....	148
4.5 Análisis bioinformático del locus At1g15020.....	152
4.5.1 Predicciones informáticas.....	152
4.5.2 Análisis proteico de la familia QSOX en <i>Arabidopsis</i>	154
4.6 Aislamiento y caracterización fenotípica de mutantes en el gen <i>AtQSO1</i>.....	156
4.6.1 Identificación de líneas mutantes del gen <i>AtQSO1</i>	156
4.6.2 La mutación del gen <i>AtQSO1</i> presenta diferentes grados de sensibilidad a cationes tóxicos.....	157
4.7 Analisis de la expresión de los genes <i>AtQSO1</i> y <i>AtQSO2</i>.....	159
4.7.1 Expresión de los genes <i>AtQSO1</i> y <i>AtQSO2</i> en diferentes tejidos.....	159
4.7.2 Expresión de los genes <i>AtQSO1</i> y <i>AtQSO2</i> en condiciones de estrés.....	161
4.8 Caracterización funcional de la proteína AtQSO2.....	163
4.8.1 La proteína AtQSO2 se ubica en la matriz extracelular.....	164
4.8.2 La proteína AtQSO2 presenta actividad sulfidril oxidasa.....	166
4.8.3 La proteína AtQSO2 no regula la expresión y/o actividad de la bomba H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática.....	167
4.8.4 La proteína AtQSO2 no regula la expresión y/o función del canal de K ⁺ AKT1 de membrana plasmática.....	168
4.8.5 El gen <i>SKOR</i> no es epistático respecto al gen <i>AtQSO2</i>	169
5. DISCUSIÓN.....	173
5.1 Búsqueda y aislamiento de mutantes resistentes a noespermidina.....	175
5.2 <i>par1-1D</i> es un mutante de ganancia de función del locus At1g15020.....	176
5.3 El gen <i>AtQSO2</i> codifica una proteína de la familia QSOX con actividad sulfidril oxidasa.....	177
5.4 El aumento de expresión de <i>AtQSO2</i> produce un fenotipo pleiotrópico de resistencia a cationes tóxicos.....	180

5.5 Fenotipo del mutante <i>qsol</i> y expresión de los genes <i>AtQSO1</i> y <i>AtQSO2</i>.....	183
5.6 <i>AtQSO2</i> no regula la toma de K^+ en la epidermis de la raíz.....	186
5.7 La acumulación de K^+ y cationes tóxicos en el xilema y la parte aérea depende de la expresión de <i>AtQSO2</i>.....	187
5.8 Un modelo para la tolerancia a cationes tóxicos regulado por <i>AtQSO2</i>.....	191
6. CONCLUSIONES.....	199
7. BIBLIOGRAFÍA.....	203
8. ANEXOS.....	235

Introducción

1.1 Mejora vegetal de cultivos alimenticios

1.1.1 Importancia de la mejora vegetal

La evolución de la economía de las sociedades humanas desde la recolección y la caza a la agricultura y ganadería hace unos 7000-8000 años fue sin lugar a dudas uno de los cambios más significativos en la historia de la humanidad ya que provocó el paso de sociedades nómadas a sociedades sedentarias. El sedentarismo, junto con la agricultura permitió una mayor densidad de población que la economía de caza y recolección y a la vez se dispuso de alimento para un mayor número de personas, permitiendo así que no todas las personas se dedicaran a la producción de alimentos, lo que generó la aparición de sociedades estatales primitivas o protoestados.

A lo largo de ocho milenios el ser humano ha logrado domesticar una ingente cantidad de especies agrícolas, ha aumentado la producción de todos los cultivos agrícolas y ha aprendido a mejorar las condiciones de su entorno para adaptarlas a la agricultura; esto junto con los grandes cambios que se han producido en la historia del hombre: aparición del estado, organización social, aparición del transporte de mercancías y el comercio, industrialización, etc., ha producido una gran transformación en la forma de vida del ser humano permitiendo una enorme mejora en las condiciones de salud, higiene y confort. Este aumento paulatino en el bienestar del ser humano ha producido un incremento exponencial de la población (Figura 1.1) y un incremento constante, pero de menor magnitud en la producción de cultivos alimenticios.

Actualmente, según datos proporcionados por distintas ONGs, existe un superávit de alimentos a nivel mundial pero la repartición de estos alimentos no es equitativa: un 40% de la producción total de cereales se utiliza como alimento de animales de granja (Dyson, 1999), animales que luego son vendidos a países industrializados donde son consumidos en grandes cantidades generando así sociedades con dietas hipercalóricas mientras existen grandes zonas del planeta donde vive gente subalimentada. El porcentaje de personas subalimentadas en el mundo ha disminuido en las últimas décadas, esto es debido al empleo, en países del tercer mundo, de variedades enanas con un aumento en la relación grano/paja obtenidas durante la llamada “*Revolución Verde*” que permiten duplicar los rendimientos del cultivo. Pero a pesar de esta mejora en la productividad de los cultivos, aún existen personas que sufren desnutrición en el mundo. Esto no solo se debe a la mala distribución de los alimentos, sino

también otros factores como las situaciones de inestabilidad política, económica y/o social en determinadas regiones del planeta que impiden un funcionamiento normal de los sistemas agrícolas y evitan cualquier forma de desarrollo económico.

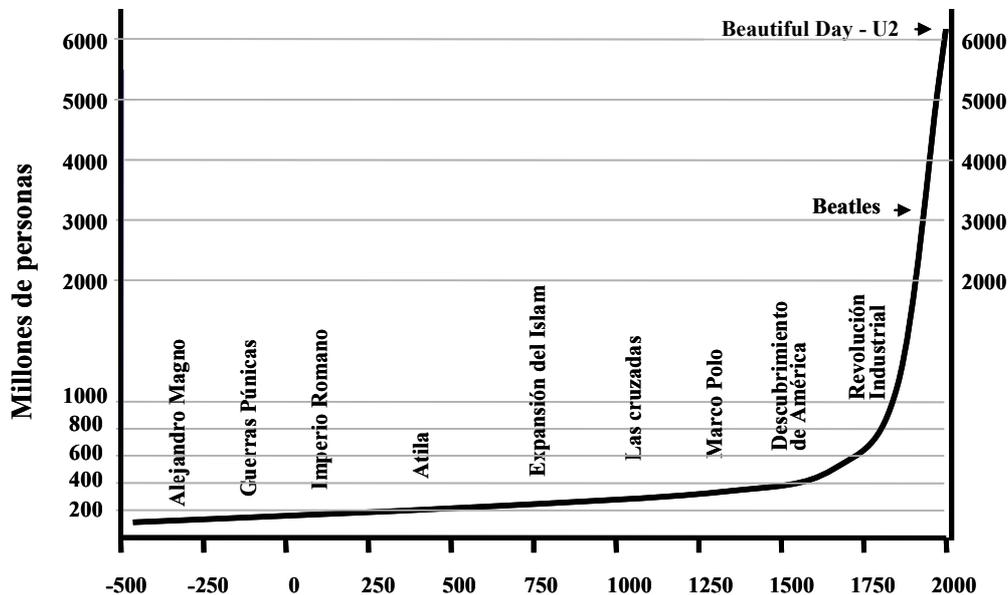


Figura 1.1 Crecimiento de la población mundial a lo largo de la historia. Adaptado de Martínez (2001).

A tenor de los datos presentados, algunos grupos han lanzado duras críticas a la biotecnología y su afán de mejorar el rendimiento de los cultivos, ya que según estos grupos, existe suficiente alimento para toda la población y la solución sería distribuirlo equitativamente para acabar con la subalimentación. Esta idea hace recordar una anécdota sobre una pequeña empresa productora de helados, la cual se quejaba de que en invierno las ventas de helados caían estrepitosamente, por lo cual contrató los servicios de una consultoría que después de un profundo análisis del problema, dió con la solución: si en invierno la gente no come helados porque hace más frío que en verano pues se tiene que producir y vender helados en invierno que no estén fríos. Soluciones existen, pero no siempre son fáciles de implantar.

Estos grupos se olvidan de las tendencias demográficas de las últimas décadas que prevén un aumento de la población de forma continua hasta llegar alrededor de los 9000 millones de personas a mediados del siglo XXI (Naciones Unidas, 2005), mientras la cantidad de terreno dedicado a la agricultura se mantendrá constante (Figura 1.2). Por lo tanto en las próximas décadas será necesario realizar un notable aumento en la producción de alimentos a pesar de la existencia de diferentes factores que limitan este incremento.

En primer lugar existe actualmente una cada vez mayor limitación en la disponibilidad de agua, por lo que el aumento de las áreas de regadío será muy limitado. Además, el crecimiento de la población en las grandes ciudades genera una presión poblacional hacia la periferia, donde se incrementa la construcción de viviendas, disminuyendo así el número de tierras agrícolas que rodean las ciudades (un ejemplo claro se puede observar en la huerta de Valencia). Finalmente, solo existen zonas de escaso valor productivo y/o elevado valor ecológico (bosques) disponibles para incrementar la superficie agrícola, lo cual plantea un conflicto entre aumentar la superficie para la producción de alimentos o el mantenimiento de la biodiversidad. Un ejemplo muy claro de este problema se puede observar en las regiones amazónicas donde cada año se deforestan 20000 km² de superficie forestal para destinarlo a plantaciones de cereales.

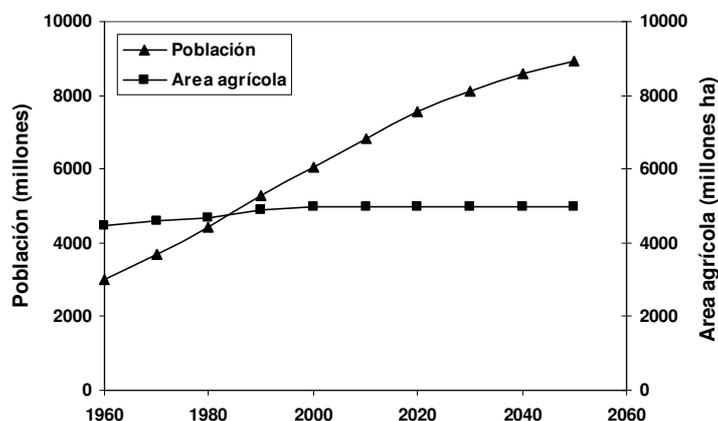


Figura 1.2 Crecimiento de la población mundial y área agrícola en el periodo 1960 – 2050. Según Naciones Unidas (2005) y James (2004).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que en la mayoría de los países con problemas de alimentos, la mayor parte de la población pobre depende exclusivamente de la agricultura local para sobrevivir. Esta agricultura local es muy rudimentaria y carente de tecnología, siendo éste un factor limitante en el desarrollo de la población, ya que el desarrollo agrícola es un paso crucial hacia la disminución de la pobreza y falta de alimentos, así como la independencia económica y tecnológica de los países industrializados (Alexandratos, 1999).

También hay que tener en cuenta que el florecimiento económico de los países industrializados producirá cambios en la demanda de la población que exigirá mayor calidad, cantidad y variedad de alimentos. Este florecimiento económico también trae consigo el mayor uso de combustibles fósiles con el consiguiente deterioro del medio ambiente y la aparición en los últimos años del fenómeno conocido como cambio climático. El cambio

climático provoca la desertización de regiones del planeta, la aparición de nuevas y/o antiguas plagas y enfermedades en los cultivos y el aumento de la temperatura global. El cambio climático es un factor muy importante en la producción de alimentos, ya que cambia las condiciones ambientales a las que los cultivos actuales están adaptadas para una producción máxima, generando una disminución en el rendimiento.

Finalmente es necesario mencionar que los logros obtenidos por la “*Revolución Verde*” (aumento en el rendimiento de las cosechas, desarrollo de variedades vegetales más productivas, disminución del porcentaje de personas subalimentadas y autoabastecimiento de alimentos en países en desarrollo) han estado basados en algunos aspectos adversos como el aumento de abonos nitrogenados y plaguicidas, el aumento del consumo de energía procedente de combustibles fósiles y una pérdida de la biodiversidad de plantas de cultivo, ya que la “*Revolución Verde*” solo se basó en la mejora de 3 grandes cultivos: trigo, arroz y maíz dejando de lado muchos otros cultivos importantes para la alimentación de numerosas personas del tercer mundo.

La “*Revolución Verde*” duplicó el volumen de producción de cereales en solo 20 años pero esto estuvo asociado a un incremento de fertilizantes nitrogenados y fosforados de 7 y 4 veces respectivamente (Tilman, 1999). El uso de estos fertilizantes ha tenido un gran impacto en la diversidad, composición y funcionamiento de los ecosistemas naturales que conviene empezar a controlar para disminuir al mínimo el daño causado y para asegurar a largo plazo el mantenimiento de la capacidad productiva del suelo.

Para enfrentarse a los problemas mencionados anteriormente, y a los que no están mencionados pero existen o están por venir, se debe dar importancia a las ciencias agrarias, tanto en la optimización de procesos agrícolas (mecanización de labores agrícolas, sistemas de irrigación, tratamientos fitosanitarios, etc...) como en la mejora y obtención de nuevas variedades vegetales con un mayor rendimiento, ya sea esto último aplicando técnicas tradicionales de mejora (cruces intervarietales, mutagénesis química, inducción de ploidía, variación somaclonal, etc...) o mediante el empleo de la biotecnología.

1.1.2 La biotecnología como herramienta para la mejora vegetal

La mejora vegetal siempre ha estado ligada a la historia del ser humano, con el aumento poblacional se necesitó seleccionar aquellos cultivos que tenían un mayor rendimiento y poseían cualidades más convenientes, ya sea en sabor, textura, facilidad de

manejo o aspecto del cultivo. Este método de selección fue un proceso muy lento y permitió tener unas pocas decenas de cultivos domesticados con las características deseadas por el hombre (aunque estas características no tienen porque ser beneficiosas para la planta en sí).

El inicio de la ingeniería genética se dió con el establecimiento de las leyes de la herencia de Gregor Mendel a mediados del siglo XIX y su posterior explicación dada por Thomas Morgan a principios del siglo XX. A partir de ese momento, la mejora de plantas cultivadas y de animales útiles para el hombre pasó de ser un proceso empírico a una actividad racional y planificada. El desarrollo de mecanismos de mutagénesis (rayos X, agentes químicos, radiación ultravioleta) o la selección somaclonal, permitieron aumentar la variabilidad genética usada como base para la selección y mejora. Esto junto con el desarrollo posterior de técnicas citogenéticas y de cultivo *in vitro* (fusión de protoplastos, obtención de haploides y dihaploides, regeneración de plantas y rescate de embriones) permitió conseguir cruces pocos probables en la naturaleza y obtener los primeros logros en mejora vegetal.

Pero en los últimos 30 años, ha habido un salto espectacular en el desarrollo de técnicas de ingeniería genética, que ha permitido actualmente poder identificar y aislar genes concretos de muchas especies vegetales, animales y microorganismos, y poder transmitirlos a la especie que se desee; también se ha desarrollado la mutación dirigida de genes (mutación de genes en levaduras y ratones por recombinación específica y mutación de genes en plantas por RNA de interferencia). En teoría, es posible secuenciar el genoma de todas las especies de la tierra e identificar y aislar la totalidad de los genes existentes, quedando a disposición de los mejoradores vegetales la casi totalidad de la diversidad génica. ¿Es necesario mencionar las grandes consecuencias que tendría esto último en el desarrollo de la agricultura y en la vida del hombre? ¿Qué no se podría lograr en la mejora vegetal si se conociera la función y regulación de todos los genes?.

Dejando de lado esta idea teórica (pero no imposible en un futuro), existen muchas ventajas actuales en la aplicación de la biotecnología en la mejora vegetal. Por ejemplo, se puede evitar la aparición de características no deseadas cuando se busca la mejora de un solo carácter al cruzar 2 genomas distintos por hibridación convencional. Otra ventaja es que se logra una mayor rapidez en la introducción de caracteres a las especies vegetales (dos o tres generaciones), evitando los repetidos cruzamientos de los individuos seleccionados con los parentales. Por último, la biotecnología promueve una agricultura más respetuosa con el medioambiente gracias a un menor uso de productos agroquímicos y a la reducción del

laboreo. Además debido al aumento del rendimiento de los “cultivos biotecnológicos” no sería necesario el aumento continuo de tierras de cultivo con la consiguiente deforestación y pérdida de diversidad biológica en diferentes partes del planeta.

Con el escaso tiempo transcurrido desde la aplicación de la ingeniería genética en la mejora de plantas, las grandes expectativas generadas en torno a su uso ya comienzan a verse materializadas en una serie de cultivos con características mejoradas, como por ejemplo los cultivos transgénicos. La superficie global de cultivos transgénicos ha ido aumentando progresivamente en los últimos 10 años (Figura 1.3), existiendo más de 20 países que cultivan transgénicos (Tabla I), además, el valor del mercado global de cultivos transgénicos fue de 6,15 billones de euros en el 2006, lo cual representa el 16% del mercado mundial de cultivos, siendo el valor global del mercado de cultivos transgénicos proyectado para 2007 de 6,8 billones de euros (ISAAA, 2006).

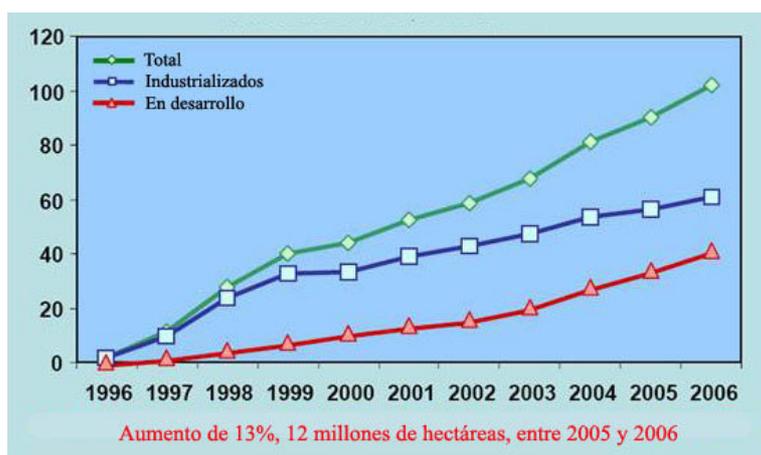


Figura 1.3 Superficie global de cultivos transgénicos en el periodo 1996-2006. Área en millones de hectáreas, adaptado de ISAAA (2006).

La “inocuidad” de los cultivos transgénicos ha sido puesta en tela de juicio por diferentes colectivos (Greenpeace, Amigos de la Tierra), los cuales se basan en 3 puntos fundamentales: la dependencia económica de los agricultores hacia las grandes compañías transnacionales de semillas y agroquímicos (Syngenta, Bayer, CropScience, Monsanto, DuPont y Dow); el peligro para el medioambiente de crear nuevas especies de forma artificial que generen un desequilibrio ecológico desplazando a otras especies de su hábitat o transmitiendo su información genética a otra especie vegetal, animal o microorganismo; y finalmente, la posibilidad de que estas plantas produzcan alérgenos para el ser humano. Sobre el primer punto, este no es el lugar idóneo para discutir si es apropiado o no el

comportamiento de estas compañías con los agricultores y el manejo de las patentes. Con respecto a los dos puntos siguientes; no se ha demostrado fehacientemente que estas acusaciones sean ciertas y los estudios llevados a cabo para demostrar estos puntos no han tenido suficiente rigor científico (Gatehouse *et al.*, 2002; Christou, 2002).

Tabla I. Superficie global de cultivos transgénicos en 2006: por país (Millones de Hectáreas)

Orden	País	Superficie	Cultivos transgénicos
1	Estados Unidos	54,6	Soja, Maíz, Algodón, Colza, Calabacín, Papaya, Alfalfa
2	Argentina	18,0	Soja, Maíz, Algodón
3	Brasil	11,5	Soja, Algodón
4	Canadá	6,1	Colza, Maíz, Soja
5	India	3,8	Algodón
6	China	3,5	Algodón
7	Paraguay	2,0	Soja
8	Sudáfrica	1,4	Maíz, Soja, Algodón
9	Uruguay	0,4	Soja, Maíz
10	Filipinas	0,2	Maíz
11	Australia	0,2	Algodón
12	Rumania	0,1	Soja
13	México	0,1	Algodón, Soja
14	España	0,1	Maíz
15	Colombia	<0,1	Algodón
16	Francia	<0,1	Maíz
17	Irán	<0,1	Arroz
18	Honduras	<0,1	Maíz
19	Republica Checa	<0,1	Maíz
20	Portugal	<0,1	Maíz
21	Alemania	<0,1	Maíz
22	Eslovaquia	<0,1	Maíz

En la actualidad, solo unas pocas variedades de plantas transgénicas se encuentran disponibles en el mercado, pero existe gran número de ellas que se encuentran en etapas de evaluación y que estarán disponibles para los agricultores en breve. Entre los cultivos transgénicos ya comercializados podemos citar las plantas-Bt resistentes a insectos (Christou *et al.*, 2006), los cultivos resistentes a herbicidas (Duke, 2005) y los cultivos resistentes a virus (Prins, 2003, Fermin *et al.*, 2005).

También se vienen desarrollando en laboratorios públicos y privados diferentes plantas transgénicas con diversas aplicaciones. Estas plantas se encuentran en diferentes fases de estudios para su futura comercialización; para conocer el estado actual de estas pruebas se puede revisar (http://www.isb.vt.edu/2002menu/regulatory_information.cfm). Como ejemplos tenemos la futura generación de plantas resistentes a insectos (Christou *et al.*, 2006), plantas resistentes a salinidad (Yamaguchi y Blumwald, 2005), plantas con una mayor cantidad de vitamina E (Dellapenna, 2005) y provitamina A (Paine *et al.*, 2005), además del desarrollo de biofármacos a partir de plantas transgénicas (Fischer *et al.*, 2004, Daniell, 2006) y la modificación de la composición en los ácidos grasos de los cultivos (Truksa *et al.*, 2006). Pero es necesario mencionar que en la Comunidad Europea solo se permiten 4 cultivos: maíz, soja, colza y algodón, esto es debido a presiones de grupos ecologistas y partidos políticos contrarios al cultivo de transgénicos.

1.2 El problema de la salinidad

1.2.1 Antecedentes históricos y estado actual del problema

En los últimos 6000 años, los seres humanos han sido incapaces de mantener una civilización estable en un lugar concreto más allá de 2000 años, siendo la causa principal la destrucción del medio (Ashraf, 1994). Uno de los factores implicados en la destrucción del medio, y que incide directamente en la productividad agrícola, es la salinización de tierras de cultivo. El declive de la civilización de los sumerios (2800-1800 a.C.), situada en los valles del Tigris y Eufrates, fue debido en gran parte a la salinización de sus suelos agrícolas. El análisis paleobotánico de los diferentes estratos de dicha región reveló una transición del cultivo de trigo (más productivo pero poco halotolerante) hacia el cultivo de cebada (menos productivo pero más halotolerante) a medida que el suelo, fértil pero sin drenaje, fue acumulando sales de forma progresiva (Jacobson y Adams, 1958).

Como se observa en el párrafo anterior, el problema de la salinidad no es un fenómeno actual, sin embargo hasta hace relativamente pocos años no se tenía conciencia de su importancia. Esto quizás fue debido a que los niveles de salinidad no eran preocupantes o no se habían estudiado bien sus efectos. Por lo tanto no se puede considerar que el problema de la salinidad empiece en nuestros días, sino que es un proceso que se ha ido gestando a lo largo del tiempo y actualmente está produciendo la disminución en el rendimiento de diversos cultivos.

Según el mapa de suelos a nivel mundial (FAO, 2006a), el área total de suelos salinos y sódicos¹ es de 836 millones de hectáreas, que corresponden al 6,3% de la superficie mundial (Tabla II). En el año 2003, de las 1500 millones de hectáreas de suelos agrícolas de secano, 33 millones (2,2%) tiene problemas de salinidad de diversa magnitud y de las 277 millones de hectáreas de suelos irrigados, 59 millones (21,3%) están afectadas por el proceso de salinización (Munns, 2005). Los suelos irrigados representan solo el 15% del área total de tierra cultivable, pero los suelos irrigados tienen una productividad de al menos el doble que los suelos de secano, así que los suelos irrigados producen la tercera parte de los alimentos consumidos en el mundo (Munns, 2005).

Tabla II. Distribución regional de los suelos afectados por salinidad. En millones de hectáreas.

Región	Área total	Suelos salinos	%	Suelos sódicos	%
África Sub-Sahariana	2423,8	48,4	2	40,0	2
América del Norte	1929,5	4,0	0.2	14,5	1
América del Sur y Central	2054,1	60,5	3	50,9	2,5
Asia, Oceanía y Australia	2868,2	167,3	6	137,0	5
Europa	680,6	7,0	1	14,6	2
Norte de África y Cercano Oriente	1154,5	72,3	6	5,7	0,4
Norte de Asia y Éste de los Urales	2075,9	42,1	2	171,6	8
Total	13186	401,6	3,0	434,3	3,3

A nivel mundial existen diferentes regiones donde el problema de la salinidad es muy pronunciado como son las regiones adyacentes a los rios Tigris y Eufrates en Irak y Siria, Mekong en el noroeste de Tailandia, Huang-Ho en el noroeste de China, Indo y Ganges en Pakistán e India, Nilo en Egipto, Murria-Darling en Australia y Colorado en California.

En América latina, la calidad de millones de hectáreas de tierras irrigadas se reduce año tras año debido a la degradación del suelo. Así por ejemplo, el 35% de tierras bajo riego en Argentina y Chile sufren problemas de salinidad, mientras que el 30% (250 000 ha) de la región costera de Perú tiene también este problema (FAO, 2006b). En Brasil, el 40% de sus tierras bajo riego, localizadas en la parte noreste, tienen niveles de moderado a severo de salinidad. En Cuba, cerca de 1,2 millones de hectáreas están afectadas por la salinidad y en México, el 33% de la superficie bajo riego se encuentra afectada (FAO, 2006b).

¹ Un suelo sódico se produce como resultado secundario de la salinidad de suelos arcillosos, donde la lixiviación que ocurre a través de procesos naturales o inducida por el ser humano disuelve las sales solubles del suelo y provoca la unión del sodio a las cargas negativas de la arcilla.

Según estadísticas proporcionadas por FAO (FAO, 2006a), en el continente europeo la salinización y el nivel de sodio en el suelo están provocando daños en las áreas más secas de la región, como en Hungría donde el problema afecta al 25% de la superficie cultivada o en Rumania donde está afectada el 7% de la superficie agrícola. Se considera que el 35% de la superficie bajo riego en la Europa Mediterránea está afectada por la salinización en grados de moderado a severo. Así, en Italia el 3,8% de la superficie agrícola está afectada por la salinidad y en España el 12 % (de la superficie agrícola) presenta el mismo problema.

1.2.2 Definición de suelo salino

Los suelos afectados por la salinidad tienen composiciones iónicas variables y una concentración en sales solubles lo suficientemente alta para afectar el desarrollo de algunas especies de plantas. Así que para caracterizar adecuadamente estos suelos se ha desarrollado un sistema de clasificación (U.S. Salinity Laboratory Staff, 2006) basado fundamentalmente en dos criterios: la salinidad expresada desde el punto de vista de la conductividad eléctrica (CE) de todos los iones disueltos en el agua y el porcentaje de sodio intercambiable (PSI). Así se distinguen las categorías siguientes (Tabla III).

Suelos salinos

En estos suelos existen sales en proporción suficiente como para aumentar la presión osmótica de la solución del suelo y dificultar de esta forma la absorción de agua por los vegetales; estos suelos tienen una fuerte concentración relativa de sales solubles como cloruros, sulfatos o nitratos y a veces bicarbonatos. Con cierta frecuencia en estos suelos están presentes algunas sales relativamente insolubles, como el sulfato de calcio (CaSO_4), carbonato de calcio (CaCO_3) y carbonato de magnesio (MgCO_3). El sodio representa menos del 50% de los cationes solubles. Estos suelos son muy sensibles a la erosión.

Suelos salino-sódicos

Son suelos con una alta concentración de sales solubles y con un alto porcentaje de sodio intercambiable. En caso de que se presente una precipitación intensa o un vertido proveniente de alguna localidad, estas sales pueden ser lixiviadas.

Suelos sódicos

Los suelos sódicos contienen un exceso de sodio intercambiable mientras que la materia orgánica se presenta dispersa (esto ocurre sobre todo al aplicar vertidos continuos).

Este sodio no es dañino para las plantas, pero hace que los suelos de textura fina se hagan extremadamente impermeables al agua y dificulta a las raíces su penetración. La solución del suelo contiene sobre todo sodio y cantidades menores de calcio y magnesio.

Tabla III. Características que definen a los suelos afectados por salinidad

Tipo de suelo afectado por sales	CE (dS.m⁻¹)	PSI (%)	pH
Salino	> 4	< 15	7,9 -8,6
Salino-sódico	> 4	> 15	< 8,6
Sódico	< 4	> 15	8,6 - 10

1.2.3 Causas de la salinidad

Dos son las condiciones necesarias para que se produzca la acumulación de sales en los suelos: el aporte de sales y la imposibilidad de eliminar las sales del suelo.

Origen de las sales

Los suelos salinos se pueden originar de forma natural o por causas humanas. El primer caso se conoce como **salinización primaria**, donde las sales proceden originalmente del proceso de meteorización de la roca madre, aunque los iones así liberados no suelen ser suficientes para formar un suelo salino. Normalmente las sales acumuladas en estos suelos provienen de otras zonas, siendo el agua (del océano, las aguas superficiales, la lluvia o las aguas subterráneas) el principal, aunque no el único, modo de transportarlas. La evaporación continua del agua en soluciones salinas determina el aumento de la concentración salina en el suelo.

Los terrenos situados en zonas costeras, por ejemplo, reciben sales del océano directamente por inundación (manglares y marismas). Las aguas superficiales en ocasiones pueden inundar tierras bajas de forma natural, dejando al evaporarse las sales sobre el terreno. También frecuentemente los suelos reciben las sales de mantos freáticos suficientemente superficiales (normalmente a menos de 3 metros). Los mantos freáticos siempre contienen sales disueltas en mayor o menor proporción y en las regiones áridas estos mantos ascienden a través del suelo por capilaridad. Además es posible que la capa freática sea poco profunda en determinadas zonas o que el suelo sea poco permeable, lo que impide el movimiento descendente del agua.

La acumulación de sales de origen eólico es otro modo de salinización. El viento en las regiones áridas arrastra gran cantidad de partículas en suspensión, principalmente carbonatos, sulfatos y cloruros que pueden contribuir en gran medida a la formación de suelos con sales.

La salinización de suelos producida por acción del hombre se denomina **salinización secundaria**. En este segundo caso las sales provienen de diferentes prácticas relacionadas con la agricultura, la ganadería y la deforestación. Así el agua empleada en el riego, las enmiendas aplicadas al suelo, los excrementos de animales, los fertilizantes químicos, y las aguas residuales son ejemplos de fuentes de sales solubles de origen antropogénico (Tanji, 2002). El uso continuado de agua de riego de pobre calidad (con sales disueltas en pequeñas cantidades) contribuye a la acumulación de sales en el suelo. Cuando se implanta el regadío en nuevas tierras sin establecer un drenaje artificial adecuado, puede ocurrir que la capa freática suba hasta aproximarse a la superficie del suelo transportando consigo sales que luego se acumulan en la superficie y en la zona radicular. También el empleo de prácticas agrícolas inadecuadas provoca una compactación del suelo provocando un inadecuado drenaje y lavado de las sales.

Impedimento de eliminación de sales

Existen dos factores principales que impiden la eliminación de sales de los suelos: los climas áridos y un mal drenaje. Así, los suelos salinos se encuentran principalmente en zonas de clima árido o semiárido, como la Comunidad Valenciana, donde el lavado de las sales es insuficiente debido a la escasez de precipitaciones. En esta zona los breves periodos húmedos provocan la disolución de las sales, y con ello su movilización, mientras que las intensas y largas sequías originan fuertes evaporaciones, que producen la ascensión de los mantos freáticos y al intensificarse la evaporación se concentran las sales, que precipitan acumulándose en zonas cercanas a la superficie y la zona radicular. En suelos con malas condiciones de drenaje, el agua circula lentamente disolviendo las sales y distribuyéndolas en las zonas superiores del suelo sin que puedan eliminarse grandes cantidades de ellas.

1.3 La salinidad y el desarrollo vegetal

1.3.1 Glicofitas *versus* halofitas

Los océanos cubren el 70% de la superficie de la tierra; la concentración de NaCl en el mar es aproximadamente 0,5 M y existen también altas concentraciones de magnesio (56

mM) y sulfatos (28 mM) así como calcio y potasio (10 mM cada uno). Si este agua, con altas concentraciones de sal y una alta proporción magnesio/calcio, fuera usada para irrigar cultivos, los resultados serían fatales para las plantas. Pero existen organismos, las algas marinas, que se desarrollan sin problemas en medio salino, siendo los principales productores primarios de la cadena trófica en los océanos (Epstein, 2003).

La discrepancia existente entre plantas en ecosistemas terrestres y marinos respecto a la salinidad plantea la cuestión de cómo se produce esta diferencia y para ello es necesario destacar dos factores. Primero, las algas marinas están rodeadas por agua y solo existe una causa para su desecación: la alta presión osmótica del medio. Las plantas terrestres crecen “hacia el sol” y su parte aérea está rodeada por la atmósfera, lo cual lleva a una pérdida de agua muy alta que puede causar la muerte (Epstein, 2003). Segundo, las algas marinas están rodeadas por un medio líquido; esto presenta dos características favorables: no existe una matriz sólida que impida el crecimiento y la agitación constante del medio genera homogeneidad química y uniformidad. Por el contrario, las plantas terrestres presentan raíces que penetran en una matriz sólida y esta matriz representa un obstáculo para el libre movimiento de solutos; así las raíces deben arreglárselas con una heterogeneidad temporal y espacial de su medioambiente físico y químico (Epstein, 2003).

En la evolución de las plantas terrestres, la habilidad para vivir en un medio salino fue perdida o nunca fue adquirida; ya que esta habilidad no es esencial para la adaptación a un medio donde el agua tiene una muy baja concentración de sales. Sin embargo, han existido y existen actualmente ecosistemas terrestres salinos que son el hábitat de plantas halofitas capaces de vivir en un ambiente adverso mediante un conjunto de adaptaciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales donde siempre se minimiza la pérdida de agua (Epstein, 2003). La consecuencia principal de estas consideraciones es que no existe una incompatibilidad biológica fundamental entre la salinidad y la vida vegetal, las algas marinas y las plantas halofitas lo atestiguan.

Es posible clasificar a las plantas terrestres basándose en su capacidad de crecimiento en un medio salino (Marschner, 1995). En esta clasificación las plantas halofitas estarían dentro del grupo I y las plantas glicofitas en el grupo II, III y IV (Figura 1.4). Al contrario que las glicofitas, las plantas halofitas son muy tolerantes a la salinidad, pudiendo crecer con una concentración de NaCl superior a 400 mM (Flowers, 2003). En general, a nivel fisiológico, las plantas halofitas han desarrollado mecanismos específicos que les permiten soportar la

salinidad del suelo, algunas poseen hojas o tallos suculentos, otras eliminan el exceso de sal reemplazando de forma continuada las viejas hojas cargadas de sal por hojas más jóvenes o a través de estructuras celulares específicas como glándulas secretoras de sal o pelos especializados (Breckle, 2002)

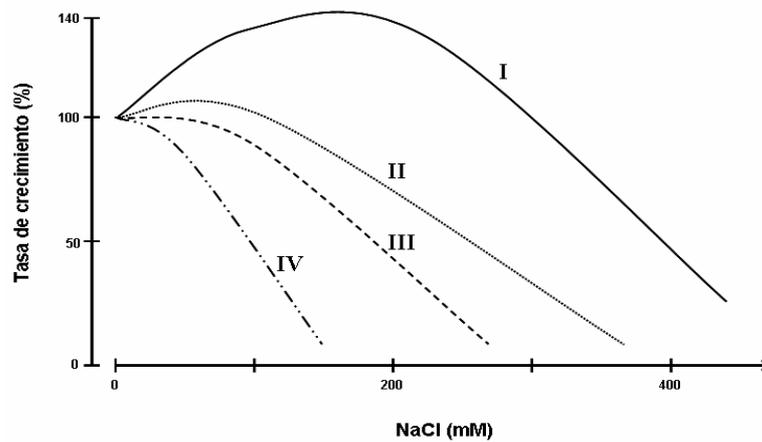


Figura 1.4 Crecimiento de distintos grupos de plantas respecto a la concentración de NaCl. I, halofitas; II, especies halofílicas similares a I (remolacha); III, plantas tolerantes a sal (cebada); IV, plantas sensibles a sal (frijol). Adaptado según Marschner (1995).

Los mecanismos de la tolerancia a sal en halofitas han sido estudiados a nivel celular, encontrándose 3 estrategias de adaptación principales: compartimentación de iones tóxicos, acumulación de osmolitos y conservación del agua (Bohnert *et al.*, 1995). Mientras la principal estrategia de las plantas glicofitas es restringir el movimiento de iones a la parte aérea mediante el control del flujo de iones al xilema de la raíz (exclusión); las plantas halofitas transportan rápidamente el sodio teniendo siempre una menor concentración de sodio en la raíz que en la parte aérea (inclusión) (Hasegawa *et al.*, 2000). Las plantas halofitas pueden usar el sodio acumulado en la parte aérea para disminuir el potencial osmótico, facilitando así el transporte de agua a la parte aérea y disminuyendo el coste metabólico de la producción de osmolitos.

La principal diferencia entre plantas halofitas y glicofitas es la capacidad de las primeras a sobrevivir a una choque salino, lo que permite a las plantas halofitas establecer más rápidamente una respuesta metabólica para crecer en un medio salino, aunque a nivel celular se ha comprobado que las enzimas de plantas halofitas son tan sensibles al sodio como las enzimas de glicofitas (Flowers *et al.*, 1977). Por lo tanto se trabaja con la hipótesis de que los mecanismos celulares de tolerancia a sal son similares en ambos tipos de plantas, y solo sutiles diferencias en su regulación causan las grandes variaciones en la tolerancia entre glicofitas y halofitas. (Niu *et al.*, 1995, Taji *et al.*, 2004).

1.3.2 Efectos causados por la salinidad en las plantas

La sal disuelta en el agua del suelo inhibe el crecimiento de las plantas por dos razones. Primero, una alta concentración de sales en el suelo genera un bajo potencial hídrico incrementando la dificultad para la planta de adquirir agua y nutrientes, esto conlleva a un crecimiento más lento; a este efecto se le conoce como **efecto osmótico** de la salinidad. Segundo, la sal entra en la planta, a través de las raíces, donde luego se distribuirá por las células del parénquima de la raíz, para pasar al xilema y llegar a la parte aérea donde se acumulara en las células de las hojas y tallos alcanzando niveles tóxicos, como consecuencia se producirá una reducción en el crecimiento. Esto se debe a dos mecanismos: a) la toxicidad iónica de la salinidad a nivel intracelular (**efecto iónico**) y b) el efecto osmótico de las sales acumuladas en el apoplasto de las hojas. Los 2 efectos producen una tasa de crecimiento en 2 fases en respuesta a la salinidad (Figura 1.5).

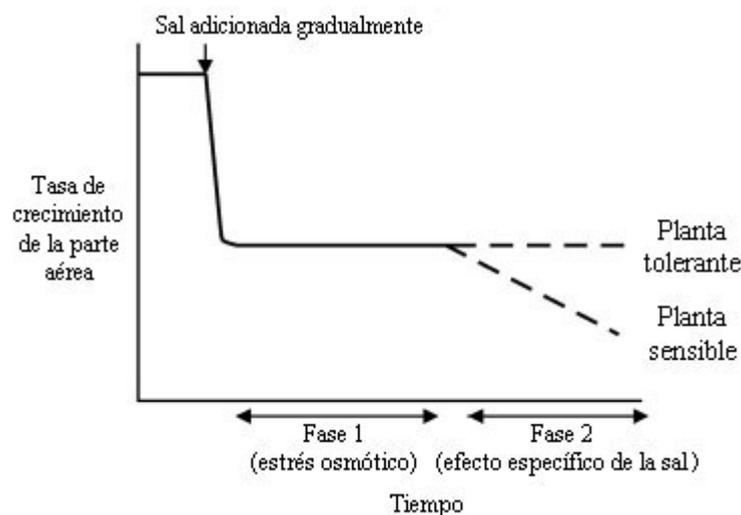


Figura 1.5 Esquema de la tasa de crecimiento en 2 fases en respuesta a la salinidad para plantas que difieren en la tolerancia a sal. La escala de tiempo pueden ser días o semanas dependiendo de las especies y nivel de salinidad. Adaptado de Munns (2005).

Una elevada concentración de NaCl o LiCl en el apoplasto celular genera efectos primarios y secundarios que afectan negativamente el crecimiento y desarrollo de la planta por los siguientes motivos (Mahajan y Tuteja, 2005):

- Ruptura del equilibrio iónico por una mayor acumulación de cationes tóxicos en el citoplasma y disminución en la entrada de K^+ a la célula.
- Na^+ y Li^+ son tóxicos para el metabolismo celular y tiene efectos inhibitorios en el funcionamiento de algunas enzimas.

- Altas concentraciones de Na^+ causan un desajuste osmótico, debido a la disminución del potencial hídrico, lo que ocasiona una pérdida de turgencia en la célula y una inhibición de la división celular, reduciendo por tanto el crecimiento de la planta.
- Un alto nivel de Na^+ conlleva a una reducción en la fotosíntesis, el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (**estrés oxidativo**) y a la activación de procesos de muerte celular programada.

Efectos primarios del estrés salino

- **Déficit de agua.** El agua es transportada desde el exterior de la planta hacia el sistema vascular por medio de 3 vías: transcelular, simplástica y apoplástica (Bennett y Khush, 2003). En la vía transcelular, las moléculas de agua entran y salen de las células a través de la membrana plasmática hasta llegar al xilema. En la vía simplástica, las moléculas de agua cruzan la membrana plasmática de una célula epidermal o cortical y luego se mueven de célula en célula a través de los plasmodesmos. El transporte de una célula a otra se realiza a través de conexiones entre células llamadas plasmodesmos, que son poros cilíndricos de 20 a 60 nm de \varnothing con una densidad de aproximada de 15 por μm^2 , que atraviesan la pared celular y ponen en contacto los citoplasmas de dos células adyacentes (Fernández y Maldonado, 2000). En la vía apoplástica, las moléculas de agua se mueven a través del espacio intercelular hasta llegar a la banda de Caspari que es impermeable, pero existen regiones discontinuas o delgadas de la banda de Caspari que permiten el paso de moléculas de agua las cuales logran llegar al xilema (Figura 1.6).

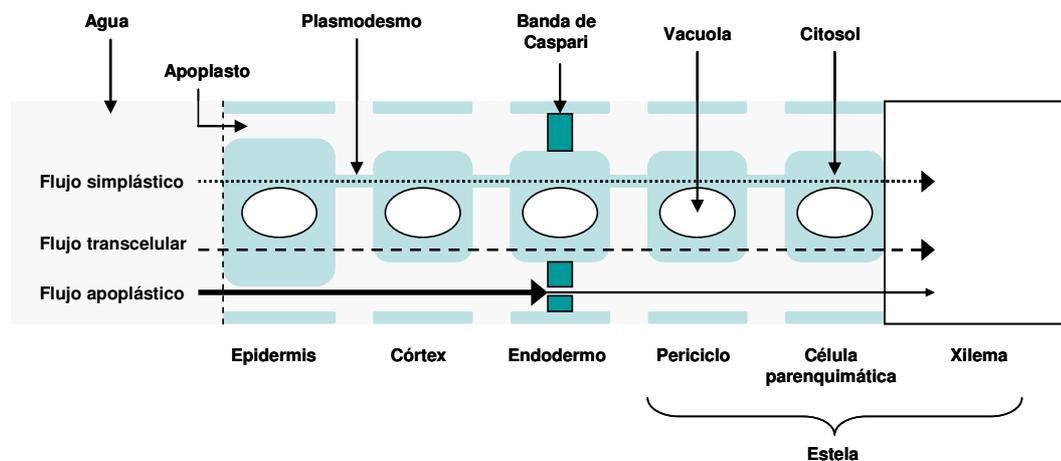


Figura 1.6. Representación esquemática del movimiento del agua a través de la raíz desde el suelo al xilema. Múltiples capas del córtex son indicadas como una célula individual. Adaptado de Bennet y Khush (2003).

Las vías transcelular y simplástica son directamente sensibles a elevadas concentraciones salinas ya que un estrés hiperosmótico va disminuyendo la diferencia de potencial osmótico entre el medio salino y el citosol hasta que se igualan y cesa la toma neta de agua por estas vías. La vía apoplástica no está directamente afectada por el medio salino y probablemente es capaz de continuar funcionando hasta que se pare la transpiración, permitiendo al agua (y las sales disueltas) entrar a la planta a través de “agujeros” en la banda de Caspari. Sin embargo, las raíces en un medio salino producen ABA que es cargado en el xilema para ser transportado a las hojas donde participa en el cierre de los estomas (Zdunek y Lips, 2001). El cierre de estomas mediado por ABA es crucial para la supervivencia de la planta a corto plazo, debido a que una disminución de la transpiración minimiza la pérdida de agua que experimenta la planta, como consecuencia de la inhibición por sal de las vías transcelular y simplástica, y además reduce el transporte de sales por la vía apoplástica, pero este cierre de estomas no puede ser a largo plazo porque se inhibiría la fotosíntesis. Con las 3 vías bloqueadas en condiciones de salinidad, las células pierden turgencia, lo que a su vez restringe la expansión celular y ralentiza el crecimiento de la planta provocando finalmente el marchitamiento.

- **Ruptura de la homeostasis iónica.** En condiciones normales, las células vegetales mantienen un flujo continuo de entrada y salida de iones, pero siempre manteniendo en el citosol unas concentraciones constantes de los iones necesarios para el normal desarrollo de la célula (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), lo que se conoce como **homeostasis iónica**. En estas condiciones las concentraciones de K^+ en el citosol varían entre 100 y 200 mM, las de Na^+ entre 1 y 10 mM, las de Ca^{2+} libre entre 100 y 200 μ M, las de Mg^{2+} entre 5 y 10 mM y las de Cl^- entre 1 y 5 mM (Marschner, 1995, Niu *et al.*, 1995).

La homeostasis iónica es dependiente de transportadores y canales de membrana (Figura 1.7) que median el flujo de iones, como H^+ -ATPasas, pirofosfatasas, Ca^{2+} -ATPasas y transportadores secundarios (antiportadores, simportadores, uniportadores).

En condiciones salinas (debido a una alta concentración de NaCl) se produce una rotura de la homeostasis iónica no solo de los iones Na^+ y Cl^- sino también del K^+ y Ca^{2+} . Inmediatamente después de un choque salino, se produce un gran aumento en la entrada de Na^+ a la célula a través de transportadores y canales de cationes no selectivos (Amtmann y Sanders, 1999, Rus *et al.*, 2001), lo que provoca una disminución del

potencial de membrana facilitando la toma pasiva de Cl^- a través de canales de aniones normalmente inhibidos por el alto potencial eléctrico (negativo dentro) (Czempinski *et al.*, 1999, Barbier-Brygoo *et al.*, 2000). La alta concentración de Na^+ provoca la disminución en la entrada de K^+ , debido quizás a la depolarización de la membrana o a una menor selectividad K^+/Na^+ en los sistemas de transporte de K^+ , provocando una drástica disminución de la tasa K^+/Na^+ (Xiong *et al.*, 2002). También se produce un incremento del Ca^{2+} citosólico que es transportado desde el apoplasto y los compartimentos intracelulares, el aumento transitorio de Ca^{2+} sirve como un mensajero secundario para poner en marcha los mecanismos de adaptación celular al estrés salino (McCormack *et al.*, 2005). Pero un nivel elevado de Ca^{2+} produce también un estrés, así que se debe reestablecer la homeostasis de Ca^{2+} mediante sistemas de transporte de Ca^{2+} (Geisler *et al.*, 2000, Pittman y Hirschi, 2003).

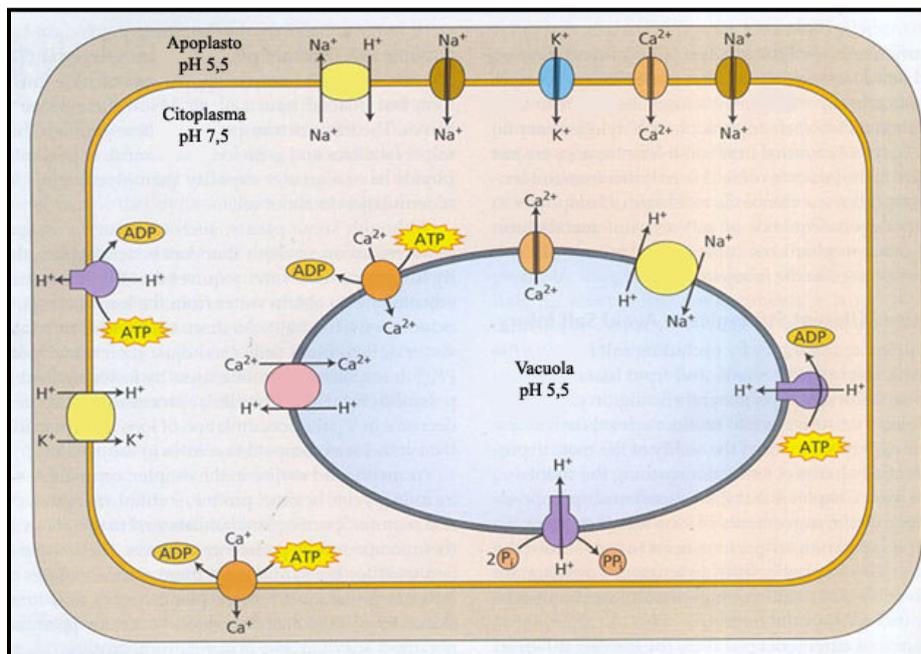


Figura 1.7 Transportadores y canales de membrana que intervienen en el flujo de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y H^+ en condiciones de estrés salino. La diferencia de voltaje a través de la membrana plasmática es de 120-200 mV (negativo dentro) y a través del tonoplasto es 0-20 mV siendo positivo dentro. (Taiz y Zeiger, 2002).

Por otro lado, se ha comprobado que la aplicación externa de Ca^{2+} reduce los efectos tóxicos del NaCl , facilitando una mayor selectividad K^+/Na^+ (Liu y Zhu, 1998). Finalmente, se ha observado que en condiciones de estrés salino los niveles de Mg^{2+} en raíces y tallos de *Psidium guajava* no varían respecto a condiciones sin estrés, pero hay una disminución del contenido de Mg^{2+} en las hojas (Parida y Das, 2005); se ha sugerido

que esta disminución del Mg^{2+} esta asociada a un menor contenido en clorofila en las hojas (Parida y Das, 2005).

- **Toxicidad iónica.** En los terrenos salinos los iones dominantes son el Na^+ y el Cl^- , el cloro es un micronutriente esencial de las plantas superiores y el sodio es importante pero no esencial para las plantas halofitas y C4. Cuando una concentración mayor de la normal esta presente en los suelos es cuando se produce un estrés salino. En la uva y varios árboles frutales, un nivel bajo de NaCl (un nivel que no permite unas condiciones de déficit de agua) produce una inhibición del crecimiento y daño en el follaje (Maas, 1993). Los árboles del genero *Citrus* y varias leguminosas, como la soja, son muy sensibles a Cl^- (Maas, 1993, Marschner, 1995). El Li^+ se encuentra en bajas cantidades en terrenos salinos (30-50 ppm) y no es un nutriente esencial para las plantas (Deverel y Fujii, 1990). Se conoce que los *Citrus* son sensibles a concentraciones bajas (0,1 mM) del LiCl (Pratt y Suárez, 1990).

La acumulación de Na^+ en el apoplasto de las hojas, que puede llegar alrededor de 500 mM, provoca una deshidratación, pérdida de turgencia y muerte de las células de las hojas (Yeo y Flowers, 1986). En hojas de guisante, la toxicidad del Na^+ y Cl^- , está asociada con la producción de radicales superóxido (O_2^-) y oxidación de lípidos, lo que sugiere que existe un estrés oxidativo (Hernández *et al.*, 1993, Hernández y Almansa, 2002). Como se ha visto antes, el exceso de Na^+ disminuye la adquisición de K^+ , que es de vital importancia para mantener la turgencia celular, el potencial de membrana y la actividad de varias enzimas en la célula (Mahajan y Tuteja, 2005). Las plantas usan un sistema de alta y baja afinidad para la toma de K^+ (Epstein *et al.*, 1963) y el Na^+ puede afectar el sistema de baja afinidad que tiene una baja selectividad K^+/Na^+ . Un simportador H^+/K^+ que media el transporte de baja y alta afinidad de K^+ es inhibido por NaCl (Fu y Luan, 1998).

Las causas de la citotoxicidad del Na^+ , Li^+ y Cl^- no son muy claras. La respuesta más simple es que estos iones interrumpen procesos celulares importantes compitiendo o reemplazando a otros iones, como K^+ , Mg^{2+} o PO_4^{3-} , en los sitios de unión de cofactores o en la estabilidad iónica de las enzimas (Bennett y Khush, 2003). Incluso las halofitas, que acumulan grandes cantidades de Na^+ y Cl^- en las células, tienen enzimas citosólicas que son tan sensibles a Na^+ como las de glicofitas (Flowers *et al.*, 1977). En el citoplasma, el Na^+ inhibe la actividad de varias enzimas como la AtAHL1, implicada en la ruta de

asimilación de sulfato (Gil-Mascarell *et al.*, 1999) y posiblemente las enzimas involucradas en la síntesis de proteínas (Flowers y Dalmond, 1992; Rausell *et al.*, 2003). El Li^+ inhibe las enzimas AtSAL1 y AtSAL2, fosfatasa de la ruta de los inositoles (Quintero *et al.*, 1996, Xiong *et al.*, 2001) y proteínas involucradas en el procesamiento del RNA (Forment *et al.*, 2002).

Efectos secundarios del estrés salino

- **Estrés oxidativo.** Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen la capacidad de causar daños oxidativos en lípidos, proteínas y DNA (Apel y Hirt, 2004) En plantas y células vegetales, existen varias fuentes de producción de ROS tales como mitocondrias, peroxisomas, cloroplastos y el apoplasto (Bolwell *et al.*, 2002, del Rio *et al.*, 2002) que las plantas pueden tolerar gracias a mecanismos de protección que incluyen moléculas y enzimas antioxidantes. Los mecanismos responsables de la generación de ROS en condiciones de estrés salino no se conocen. En fagocitos, la generación de H_2O_2 es provocada por factores de crecimiento a través de la NADPH oxidasa de membrana plasmática (Rhee, 1999) y en plantas, las NADPH oxidasas son responsables de la generación de H_2O_2 (Laloi *et al.*, 2004). Sin embargo, el equilibrio existente entre la producción y la degradación de ROS puede ser perturbado por diferentes estreses abióticos entre los que se encuentra el estrés salino (Apel y Hirt, 2004).

Existen varios trabajos donde se observa que el estrés salino podría producir ROS en plantas (Tsugane *et al.*, 1999, Menezes-Benavente *et al.*, 2004, Foyer y Noctor, 2005, Skopelitis *et al.*, 2006, Cavalcanti *et al.*, 2007), entre estas especies reactivas de oxígeno se incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (OH^\cdot) y aniones superóxido (O_2^\cdot). Utilizando micromatrices, se ha observado en arroz un aumento de la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo en condiciones de salinidad (Chao *et al.*, 2005) y en la planta halofita *Suaeda aegyptica* se observó que enzimas relacionadas con la tolerancia a estrés oxidativo se sobreexpresaban después de un estrés salino (Askari *et al.*, 2006).

- **Disminución de la fotosíntesis y respiración.** El nivel de salinidad y el área foliar son inversamente proporcionales. Esta puede ser una de las razones por la cual la fijación de CO_2 y la pérdida de agua a través de las hojas disminuya; además, la respiración nocturna aumenta, lo que lleva a una aún más drástica reducción en la asimilación neta de CO_2 (Marschner, 1995). El estrés salino puede incrementar la tasa de respiración de las raíces,

ya que las raíces necesitarían compartimentar iones tóxicos, mantener el potencial de membrana y reparar los daños celulares (Schwarz y Gale, 1981).

En hojas de batata, la salinidad provoca un aumento de la vacuolación, un hinchamiento del retículo endoplasmático y mitocondria, disminución de las crestas mitocondriales, fragmentación de la vacuola y degradación del citoplasma al entrar en contacto con el citoplasma vacuolar (Mitsuya *et al.*, 2000). La salinidad provoca un redondeamiento de las células, una disminución del espacio intercelular y una reducción en el número de cloroplastos en patata (Bruns y Hecht-Buchholz, 1990). La clorofila y los carotenoides de las hojas disminuyen durante el estrés salino (Parida *et al.*, 2004), sin embargo, las antocianinas aumentan significativamente (Kennedy y De Fillippis, 1999).

Todos estos factores mencionados anteriormente contribuyen a una disminución en la actividad fotosintética de la planta sometida a estrés salino, que se pueden resumir en: (1) reducción en la toma de CO₂, (2) deshidratación de la membrana celular que reduce la permeabilidad a CO₂, (3) toxicidad iónica, (4) disminución del área foliar y senescencia por efecto de la salinidad y (5) cambios en la actividad enzimática debido a cambios en la estructura citoplasmática.

- **Cambios hormonales.** Los cambios hormonales en respuesta a la salinidad son similares a los que ocurren en condiciones de sequía; en estos casos, los niveles de citoquininas disminuyen (Kuiper *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1992, Fricke *et al.*, 2006) y los niveles de ácido abscísico (ABA) se incrementan (Christmann *et al.*, 2006). El ABA puede estar involucrado en la regulación del ciclo celular (Wang *et al.*, 1998), ya que el estrés salino afecta la expresión de genes del ciclo celular (Bursens *et al.*, 2000). Sin embargo, el mayor efecto de ABA es la estimulación del cierre de los estomas, teniendo como consecuencia una disminución de la fotosíntesis. El ABA también puede promover el desarrollo de la raíz y la parte aérea en condiciones de estrés salino o sequía disminuyendo la producción de etileno (Sharp y LeNoble, 2002), que tiene un efecto inhibitorio en la elongación de la raíz y la expansión de las hojas. A nivel molecular, el ABA induce la expresión de numerosos genes envueltos en la transducción de señal (Rock, 2000) y modifica la expresión de genes que codifican canales de cationes (Pilot *et al.*, 2003).

Poliaminas como la putrescina, espermina y espermidina se acumulan en las plantas en respuesta a un estrés salino (Krishnamurthy y Bhagwat, 1989; Maiale *et al.*,

2004; Legocka y Kluk, 2005, Bagni *et al.*, 2006), esta acumulación puede ayudar a una estabilización de las membranas, a un aumento en la síntesis de proteínas y a la prevención de la degradación de ácidos nucleicos (Marschner, 1995).

1.4 Mecanismos de adaptación al estrés salino

El estrés salino induce modificaciones a todos los niveles de la estructura biológica de la planta, desde la expresión de genes hasta la morfología y desarrollo de la planta. Para disminuir los efectos producidos por la salinidad, las plantas han desarrollado un conjunto de mecanismos bioquímicos y moleculares que actúan de forma individual, aditiva o sinérgica. Como se ha visto anteriormente, la salinidad produce a nivel celular un efecto iónico y un efecto osmótico. El mecanismo principal para compensar el efecto osmótico es la acumulación de osmolitos compatibles en el citosol (Hasegawa *et al.*, 2000).

Los mecanismos para la tolerancia específica a iones tóxicos durante un estrés salino son de dos tipos: mecanismos que minimizan la entrada de iones tóxicos en la planta y mecanismos que disminuyen la concentración de iones tóxicos en el citoplasma. Para disminuir la entrada y concentración de iones tóxicos a nivel intracelular se requiere el funcionamiento de procesos que sean capaces de regular y controlar la adquisición del ion tóxico y su expulsión, además de facilitar su compartimentación en vacuola (Hasegawa *et al.*, 2000, Zhu, 2003). El estrés salino genera la aparición de ROS, que deben de ser eliminados de las células por medio de la inducción de ciertas enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa (Xiong y Zhu, 2002). Todos estos mecanismos deben ser regulados por un conjunto de moléculas y sensores que integran vías de señalización en respuesta a estrés salino (Xiong y Zhu, 2002).

1.4.1 Exclusión e inclusión de iones tóxicos

La adaptación de las plantas mediante la exclusión de iones tóxicos requiere mecanismos adicionales para evitar un déficit de agua en el interior de la célula, ya que una concentración de iones alta en el exterior de las células aumentaría la presión osmótica y provocaría la salida de agua de las células. La inclusión de iones tóxicos en la planta requiere de una alta tolerancia de las células a Na^+ y Cl^- (por ejemplo, mediante compartimentación vacuolar) o evitando su acumulación en tejidos importantes de la planta (Marschner, 1995).

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

En las glicofitas, donde se encuentran la mayoría de las especies cultivables, el principal mecanismo para tolerar la salinidad es la exclusión de iones tóxicos, aunque decir que las glicofitas excluyen los iones tóxicos es relativo, ya que toman iones tóxicos pero en mucha menor cantidad que las especies que usan el mecanismo de inclusión de iones tóxicos.

Como ejemplos de cultivos que excluyen iones tóxicos (Na^+ y Cl^-) se conocen el trigo (Munns, 2005) y el maíz (Marschner, 1995). La alubia, especie sensible a la salinidad, tiene una alta eficiencia en la exclusión de Na^+ pero no de Cl^- , y la acumulación del Cl^- es la principal razón para su sensibilidad a estrés salino (Marschner, 1995). También en el caso de *Trifolium alexadrinum*, una leguminosa forrajera, su tolerancia a la salinidad se atribuyó a su capacidad para excluir iones Na^+ y Cl^- (Ashraf y O'Leary, 1994).

No obstante, no debe considerarse la exclusión de iones tóxicos como un mecanismo general de las glicofitas para tolerar altas concentraciones salinas, ya que la caña de azúcar se encuentra entre las especies que usan el mecanismo de inclusión de Na^+ y Cl^- para tolerar la salinidad (de forma similar a las halofitas), al igual que la cebada, que presenta también una mayor tolerancia a la salinidad asociada a una mayor acumulación de Na^+ (Marschner, 1995).

1.4.2 Flujo a través de la membrana plasmática y compartimentación de iones tóxicos

Los canales de cationes no selectivos (NSCC) son considerados los principales sistemas de transporte para la incorporación intracelular de Na^+ (Demidchik *et al*, 2002) y posiblemente también de Li^+ . Actualmente se desconoce el sistema de entrada de policationes tales como poliaminas (noespermidina, espermidina, espermina) y antibióticos aminoglucósidos (higromicina B). Sin embargo se tiene hoy en día mucha información acerca de la entrada, salida y compartimentación de Na^+ y Cl^- (Figura 1.8).

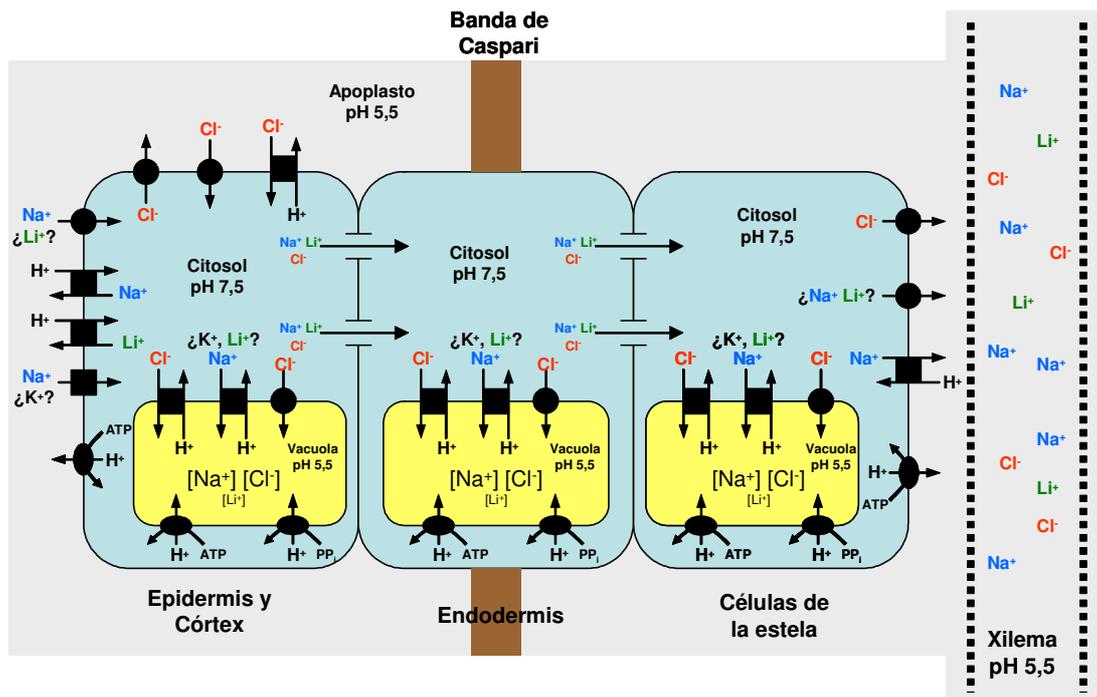


Figura 1.8. Movimiento de Na⁺, Cl⁻ y Li⁺ a través de la raíz. El Na⁺ puede entrar en la raíz a través de canales NSCC o mediante transportadores del tipo HKT y LCT1. El Cl⁻ entra a la célula mediante canales OR-DAACs o a través de antiportadores. El Li⁺ es posible que entre a la raíz a través de canales NSCC. El movimiento de iones debe realizarse a través del sistema simplástico, ya que el apoplasto presenta una barrera impermeable en la endodermis llamada banda de Caspari. Una vez dentro de la célula, el Na⁺ y el Li⁺ pueden ser compartimentados en la vacuola mediante antiportadores del tipo NHX, además el Na⁺ y Li⁺ pueden ser transportados fuera de la célula también mediante antiportadores del tipo NHX. El Cl⁻ puede ser compartimentado en vacuola mediante canales del tipo VCL o antiportadores, también puede ser transportado al exterior de la célula a través de canales del tipo ARAC (canales de salida de aniones). Finalmente estos iones pueden ser cargados en el xilema a través de canales de aniones en el caso del Cl⁻, canales NSCC para el Na⁺ y Li⁺, y el antiportador SOS1 en el caso del Na⁺. Múltiples capas del córtex son indicadas como una célula individual. En la figura se representan los transportadores (cuadrados), canales (círculos) y bombas de protones (elipses).

Los iones de Na⁺ pueden entrar en la célula a través de transportadores de Na⁺ de alta afinidad como HKT1 (Horie y Schroeder, 2004, Horie *et al.*, 2007), canales de cationes no selectivos (Demidchik *et al.*, 2002, Essah *et al.*, 2003) y transportadores de cationes de baja afinidad (Schachtman *et al.*, 1997). HKT1 funciona como una vía de toma de Na⁺ en trigo, donde la expresión antisentido de este transportador produce una disminución en la entrada de Na⁺ a través de las raíces y una mayor tolerancia a NaCl (Laurie *et al.*, 2002). También en *Arabidopsis*, mutantes de pérdida de función de HKT1 suprimen la hipersensibilidad a Na⁺ que presenta el mutante *sos3*, sugiriendo que AtHKT1 actúa como un sistema de entrada de Na⁺ (Rus *et al.*, 2001). Plantas de arroz expuestas a estrés salino muestran una disminución en los niveles de mRNA de *HKT1*, lo que plantea una regulación donde la disminución de la expresión de HKT1 reduce la toma de Na⁺ en condiciones de estrés salino (Golldack *et al.*, 2002). Pero parece ser que HKT1 no tiene como función principal la toma de Na⁺ del medio,

ya que en los mutante *hkt1* de *Arabidopsis*, el contenido de Na^+ es más elevado en la parte aérea y más reducido en la raíz (Berthomieu *et al.*, 2003, Rus *et al.*, 2004) por lo que se ha planteado que AtHKT1 esta implicado en la regulación de la distribución de Na^+ entre raíz y parte aérea (Berthomieu *et al.*, 2003, Sunarpi *et al.*, 2005).

El flujo de Na^+ hacia el exterior de la célula es un proceso dependiente de energía, en el que la familia AHA de H^+ -ATPasas (Sze *et al.*, 1999) genera un gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana plasmática que permite a los antiportadores Na^+/H^+ acoplar el movimiento pasivo de H^+ hacia dentro de la célula con la salida activa de Na^+ (Apse y Blumwald, 2002). El mutante *sos1* de *Arabidopsis* fue aislado de un análisis de mutantes hipersensibles a NaCl (Wu *et al.*, 1996), posteriormente se determinó que SOS1 (AtNHX7) codifica un antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática (Shi *et al.*, 2000, Quintero *et al.*, 2002). La sobreexpresión de SOS1 en plantas de *Arabidopsis* produce un aumento en la tolerancia a la salinidad, lo que confirma la importancia de la salida de Na^+ de la célula para la adaptación a estrés salino (Shi *et al.*, 2003). También se ha planteado que la función de SOS1 no es solo la extrusión de Na^+ de las células epidérmicas sino la regulación de la distribución de Na^+ desde la raíz a la parte aérea (Shi *et al.*, 2002, Berthomieu *et al.*, 2003, Sunarpi *et al.*, 2005).

Un mecanismo importante para reducir la acumulación de Na^+ en el citosol es transportarlo a la vacuola, donde el Na^+ no tiene contacto con las enzimas citosólicas; esta compartimentación de Na^+ en la vacuola ayuda a contrarrestar el bajo potencial osmótico extracelular creado por el estrés salino (Xiong y Zhu, 2002). El transporte de Na^+ al interior de la vacuola es llevado a cabo por antiportadores Na^+/H^+ , los cuales utilizan el gradiente electroquímico generado por las bombas de protones vacuolares H^+ -ATPasa y H^+ -pirofosfatasa (H^+ -PP_iasa). La compartimentación vacuolar de Na^+ en plantas se lleva a cabo mediante antiportadores del tipo NHX, en *Arabidopsis*, estos antiportadores vacuolares forman una familia génica compuesta por 6 miembros *AtNHX1-6* (Yokoi *et al.*, 2002, Aharon *et al.*, 2003). Mutantes *nhx1* en *Arabidopsis* muestran un incremento en la sensibilidad a NaCl (Apse *et al.*, 2003). La sobreexpresión de *AtNHX1* en *Arabidopsis*, colza, tomate y algodón produjo plantas transgénicas con mayor tolerancia a la salinidad (Apse *et al.*, 1999; Zhang y Blumwald, 2001, Zhang *et al.*, 2001, He *et al.*, 2005). Un homólogo de *AtNHX1* fue identificado en arroz (*OsNHX1*) y su sobreexpresión produjo un aumento de la tolerancia a salinidad (Fukuda *et al.*, 2004).

Se ha comprobado que AtNHX1 no solo transporta Na⁺ al interior de la vacuola, sino que también puede transportar K⁺ y Li⁺ (Venema *et al.*, 2002, Apse *et al.*, 2003, Yamaguchi *et al.*, 2003, Qiu *et al.*, 2004). Finalmente, plantas transgénicas sobreexpresando *AtAVP1* (H⁺-PP_iasa vacuolar) muestran un aumento en la tolerancia a la salinidad que correlaciona con un incremento en el contenido de iones en la planta (Gaxiola *et al.*, 2001). Este resultado sugiere que un aumento en la bomba de protones vacuolar provee una fuerza motora adicional para la acumulación de Na⁺ mediante el antiportador vacuolar NHX1 (Apse y Blumwald, 2002).

En el caso de Li⁺, no se conocen los mecanismos de entrada pero es muy posible que el Li⁺ entre a la célula mediante canales de tipo NSCC. De lo que sí hay constancia es de 2 antiportadores catión/protón que mantienen la homeostasis iónica y actúan en la detoxificación de Li⁺, estos transportadores son GmCAX de soja (Luo *et al.*, 2005) y AtNHX8 de *Arabidopsis* (An *et al.*, 2007).

La entrada de Cl⁻ a las células en condiciones de estrés salino puede ser de forma pasiva, ya que un exceso de Na⁺ produce una depolarización de la membrana plasmática (Roberts, 2006). La toma de Cl⁻ se produce para mantener la electroneutralidad en la toma de Na⁺, además de prevenir la excesiva depolarización de la membrana plasmática inducida por Na⁺ (Roberts, 2006). Se ha propuesto que la depolarización de la membrana plasmática inducida por Na⁺ activa los OR-DAACs (canales rectificadores de salida de aniones activados por depolarización) resultando en una entrada pasiva de Cl⁻ en condiciones salinas (Skerret y Tyerman, 1994, Diatloff *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2004) que puede ser inhibida por cationes di y trivalentes (Skerrett y Tyerman, 1994, Lorenzen *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando se reestablezca el potencial de membrana, se necesitará un transporte activo para la toma de Cl⁻, para lo que existen mecanismos simportadores H⁺/Cl⁻ en membrana plasmática (Felle, 1994).

La salida de Cl⁻ de las células epidérmicas y del córtex se realiza mediante canales de salida de aniones (ARACs) que han sido descritos en raíces de *Arabidopsis* (Kiegle *et al.*, 2000, Dauphin *et al.*, 2001, Diatloff *et al.*, 2004) y en pelos radiculares de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata* (Dauphin *et al.*, 2001). La compartimentación de Cl⁻ en la vacuola puede deberse a un transporte pasivo, ya que un potencial de membrana de +50 mV en la vacuola es suficiente para facilitar la entrada de Cl⁻ a través de un canal permeable de aniones (Schroeder, 1995, Hechemberger *et al.*, 1996, Czempinski *et al.*, 1999, White y Broadley, 2001). Se ha identificado un canal vacuolar de Cl⁻ (VCL) en células oclusivas de *Vicia faba*

(Pei *et al.*, 1996). También se ha propuesto la presencia de un antiportador Cl^-/H^+ en la vacuola (White y Broadley, 2001).

1.4.3 Regulación de la distribución de Na^+ y Cl^- en la parte aérea

Para mantener una homeostasis iónica adecuada en la parte aérea, existen diversos procesos que tienen como principal función restringir la acumulación de Na^+ y Cl^- en células y tejidos importantes para la planta. Estos procesos incluyen la regulación del transporte de Na^+ en la raíz y su liberación al xilema (Zhu, 2002, Tester y Davenport, 2003), la reducción del contenido de Na^+ en la parte aérea por recirculación a la raíz a través del floema (Berthomieu *et al.*, 2003, Tester y Davenport, 2003, Munns, 2005, Sunarpi *et al.*, 2005), la acumulación de Na^+ y Cl^- en células metabólicamente poco activas (Marschner, 1995), la utilización de glándulas especializadas como sumideros salinos (Breckle, 2002) y la acumulación de Na^+ en hojas adultas (Marschner, 1995, Zhu, 2002, Munns, 2002).

Los iones transferidos al xilema en la raíz son transportados a la parte aérea por el flujo de transpiración de la planta (Munns, 2002, Munns, 2005). Una respuesta rápida de la planta sería la reducción del flujo transpiratorio mediante el cierre de los estomas, pero esta solución no se puede mantener a largo plazo ya que es necesaria la fijación del carbono y el transporte de solutos en la planta, procesos que estarían limitados por el cierre estomático durante periodos largos (Hasegawa *et al.*, 2000).

A medida que avanza el flujo de agua por las células de la raíz disminuye el número de iones tóxicos que entrarán en la corriente de transpiración, esto se debe principalmente a que en las células de la raíz se lleva a cabo una compartimentación de Na^+ y Li^+ en la vacuola mediante los antiportadores catión/ H^+ del tipo NHX (Blumwald, 2000, Qiu *et al.*, 2004) y de Cl^- , como se explica en el apartado anterior. También, la disminución en la acumulación de Na^+ en la parte aérea se puede llevar a cabo mediante la reducción de la carga de Na^+ en el xilema o por el aumento de la extracción de Na^+ del xilema antes de que éste llegue a la parte aérea (Tester y Davenport, 2003). Se conoce que el ABA inhibe la carga de Cl^- en el xilema (Gilliham y Tester, 2005), además, ABA estimula la salida de H^+ de las células del parénquima xilemático hacia el xilema (Clarkson y Hanson, 1986) lo que tendería, en principio, a estimular la actividad de antiportadores Na^+/H^+ en la membrana plasmática de las células parenquimáticas de xilema (Tester y Davenport, 2003), pero principalmente aumentaría el potencial de membrana disminuyendo la carga pasiva de Na^+ en el xilema.

Se ha visto que las H⁺-ATPasas localizadas en la membrana plasmática de la endodermis son importantes en la carga de Na⁺ en el xilema, ya que en *Atriplex numularia* la adición de NaCl incrementa los niveles de mRNA de una H⁺-ATPasa de membrana (Niu *et al.*, 1993), además un mutante de *Arabidopsis* que presenta una actividad reducida de una H⁺-ATPasa endodérmica es sensible a estrés salino y presenta una mayor acumulación de Na⁺ en la parte aérea en condiciones de salinidad (Vitart *et al.*, 2001) que posiblemente se deba a una disminución del potencial de membrana lo que produciría una carga de Na⁺ en el xilema de forma pasiva a través de canales.

También se ha comprobado que el inositol estimula la transferencia de Na⁺ a la parte aérea en la planta halofita *Mesembryanthemum crystallinum* (Nelson *et al.*, 1999). El inositol es sintetizado en las hojas en respuesta al estrés salino y es transportado a la raíz por el floema, donde incrementa la carga de Na⁺ en el xilema para facilitar una disminución del potencial osmótico en la parte aérea. Este aumento en el transporte de Na⁺ puede deberse a la presencia de simportadores Na⁺/inositol (ITRs) ubicados en las vacuolas de las células de la raíz de *M. crystallinum*; los ITRs son inducibles por estrés salino y se han encontrado homólogos en *Arabidopsis* (Chauhan *et al.*, 2000).

Se ha propuesto un modelo del transporte de Na⁺ a la parte aérea en donde SOS1 cumple la función de carga de Na⁺ en el xilema a nivel de la raíz cuando existen bajos niveles de Na⁺ en el xilema (~2 mM); mientras que en condiciones de estrés salino, donde la concentración de Na⁺ en el xilema es 10 veces mayor que en condiciones normales (~20 mM), SOS1 actúa descargando de Na⁺ el xilema en la parte alta de la raíz (Shi *et al.*, 2002, Horie *et al.*, 2004). Este modelo requiere una reversibilidad en la dirección del transporte de Na⁺ de SOS1 en las células del parénquima del xilema; esta bidireccionalidad en el transporte de Na⁺ ha sido observada en el antiportador H⁺/Na⁺ SOD2 de *S. pombe* (Hahnenberger *et al.*, 1996, Shi *et al.*, 2002).

Finalmente, se ha propuesto un modelo para explicar la recirculación del Na⁺ desde la parte aérea hacia la raíz, donde HKT1 interviene en la carga de Na⁺ al floema en la parte aérea y en la descarga de Na⁺ del floema en la raíz (Berthomieu *et al.*, 2003; Horie *et al.*, 2004). Pero este modelo ha sido modificado últimamente y se propone que la función principal de HKT1 es recuperar parte del Na⁺ del xilema en la raíz durante un estrés salino para evitar la acumulación de Na⁺ en la parte aérea (Sunarpi *et al.*, 2005, Davenport *et al.*, 2007).

1.4.4 Moléculas, sensores y vías de señalización que regulan la homeostasis iónica

Los efectos del estrés salino incluyen un componente iónico y un componente osmótico, éste último incluye efectos mediados por ABA. Las vías de señalización que se originan por el componente iónico del estrés salino conocidas hasta ahora están circunscritas específicamente al Na^+ ; no se sabe casi nada acerca del efecto del Cl^- y menos aún del efecto del Li^+ y policationes en estas vías de señalización. Además, los mecanismos de percepción del estrés salino no se conocen, pero pueden incluir proteínas receptoras específicas de iones o canales inducidos por estrés salino (Tester y Davenport, 2003). Las vías de señalización activadas por el estrés salino, desde el sensor o receptor que percibe el estrés salino hasta la alteración de la actividad de una proteína específica o la transcripción de un gen, están compuestas por moléculas que actúan como segundos mensajeros, proteínas de fosforilación y defosforilación que actúan en cascadas de señalización y factores de transcripción (Hasegawa *et al.*, 2000, Schroeder *et al.*, 2001, Xiong y Zhu, 2002, Tester y Davenport, 2003, Chinnusamy *et al.*, 2004).

Actividad citosólica y extracelular del Ca^{2+}

Se conoce que la adición extracelular de Na^+ induce el aumento transitorio del Ca^{2+} libre citosólico (Sanders *et al.*, 1999; Knight, 2000). La fuente de este Ca^{2+} citosólico puede ser intracelular o extracelular y se debe a los cambios en la actividad de canales y transportadores de Ca^{2+} ubicados en la membrana plasmática, tonoplasto y membranas internas (Muir y Sanders, 1997; Tester y Davenport, 2003). Se ha demostrado que el estrés osmótico induce la actividad del canal de Ca^{2+} activado por IP_3 (Knight *et al.* 1997, Takahashi *et al.*, 2001) y que la aplicación exógena de IP_3 produce una liberación de Ca^{2+} de las vacuolas al citoplasma (Schumaker y Sze, 1987, Allen *et al.*, 1995, DeWald *et al.*, 2001), aumentando en ambos casos la concentración de Ca^{2+} citosólico.

Una vez que el nivel de Ca^{2+} citosólico aumenta como consecuencia de un estrés salino, éste puede actuar como segundo mensajero de la transmisión de señal en la cascada de señalización de proteínas SCaBPs (proteínas con sitios de unión a calcio similares a SOS3), como molécula señal de las proteínas CDPKs (proteínas quinasas dependientes de calcio), como molécula señal para la inducción de la actividad de las acuaporinas o puede inducir el cierre de los plasmodesmos (Holdaway-Clarke *et al.*, 2000, Reddy, 2001, Gerbeau *et al.*, 2002, Zhu, 2003, Chinnusamy *et al.*, 2004, Hirschi, 2004).

Un aumento en la concentración externa de Ca^{2+} puede estimular la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática vía proteínas quinasas activadas por calmodulina/ Ca^{2+} (Klobus y Janicka-Russak, 2004). Bajo estrés salino, el incremento de la actividad de la H^+ -ATPasa es necesario para repolarizar la membrana (que se depolariza por la entrada de Na^+), además la salida de Na^+ a través del antiportador SOS1 requiere de la actividad H^+ -ATPasa (Shabala *et al.*, 2006). El Ca^{2+} extracelular también produce una protección a largo plazo contra el estrés salino estabilizando los componentes de la pared celular, así como los lípidos y proteínas de la membrana plasmática (Kinraide, 1998; Cramer, 2002).

La tolerancia al estrés salino no esta basada solo en la restricción de la entrada de Na^+ al citosol, sino también en el mantenimiento de un alto nivel en la tasa de K^+/Na^+ citosólico (Maathuis y Sanders, 1999, Chen *et al.*, 2005) y es sabido que el Ca^{2+} extracelular favorece la toma de K^+ y aumenta la selectividad K^+/Na^+ en el transporte a través de la membrana plasmática, en condiciones de estrés salino (Maathuis y Sanders, 1999, Zhu, 2003). Así tenemos que el Ca^{2+} extracelular disminuye la toma de Na^+ al interior de la célula a través de la inhibición de los canales de cationes no selectivos (NSCCs) presentes en la membrana plasmática (Demidchik *et al.*, 2002, Tester y Davenport, 2003) y también una elevada concentración de Ca^{2+} externo disminuye la salida de K^+ de la célula, a través de la inhibición de canales rectificadores de salida de K^+ , en condiciones de estrés salino (Shabala *et al.*, 2006).

Fosforilación y defosforilación de proteínas

Existe un gran número de proteínas quinasas y fosfatasas en plantas que probablemente están relacionadas con la respuesta al estrés salino (Xiong *et al.*, 2002) y es posible que alguna histidina quinasa unida a membrana pueda actuar como sensor de Na^+ , de manera similar a como ocurre en la cianobacteria *Synechocystis* (Marin *et al.*, 2003). Como ejemplos de quinasas y fosfatasas envueltas en la respuesta a estrés salino tenemos, la glicogeno sintasa quinasa AtGSK1 (Piao *et al.*, 2001), las fosfatasas metabólicas SLT1 y la familia HAL2 de *Arabidopsis* (Gil-Mascarell *et al.*, 1999, Matsumoto *et al.*, 2001), las proteínas CDPKs (Saijo *et al.*, 2000, Chinnusamy *et al.*, 2004, Ludwig *et al.*, 2004), la proteína quinasa SOS2 de *Arabidopsis* (Halfter *et al.*, 2000), cascadas de señalización de MAPK (Ichimura *et al.*, 2000, Chinnusamy *et al.*, 2004, Nakagami *et al.*, 2005), proteínas histidina quinasas de dos componentes (Urao *et al.*, 1999, Hwang *et al.*, 2002) y proteínas

fosfatasa activadas por calmodulina/ Ca^{2+} (Pardo *et al.*, 1998, Kudla *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2005).

Funcion de la vía SOS en el transporte de Na^+

La cascada de señalización de SOS dependiente de Ca^{2+} es una de las vías de señalización mejor caracterizadas que regula la homeostasis iónica (Qiu *et al.*, 2002, Zhu, 2003). SOS1, SOS2 y SOS3 son los componentes fundamentales de esta vía. SOS3 es un sensor de Ca^{2+} que codifica una proteína de unión a Ca^{2+} (ScaBP) con un motivo de N-miristoilación y tres sitios de unión a Ca^{2+} del tipo “*EF hand*”. Esta proteína se activa por medio de variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Liu y Zhu, 1998, Ishitani *et al.*, 2000). SOS3 interacciona físicamente y activa a SOS2, una serina/treonina proteína quinasa (Halfter *et al.*, 2000) y este complejo SOS3/SOS2 activa mediante fosforilación al antiportador Na^+/H^+ SOS1 (Quintero *et al.*, 2002, Zhu, 2003). La miristoilación de SOS3 es crítica en este proceso, ya que esto permite a SOS3 “reclutar” a SOS2 y llevarlo a la membrana plasmática donde fosforilará a SOS1 (Ishitani *et al.*, 2000, Quintero *et al.*, 2002).

Se ha sugerido que la vía SOS (Figura 1.9) puede tener otras funciones (Chinnusamy *et al.*, 2004, Shabala *et al.*, 2005). Se ha planteado que el complejo SOS3/SOS2 puede prevenir la entrada de Na^+ inactivando la proteína HKT1 o disminuyendo su expresión durante un estrés salino (Zhu, 2002). Además, la actividad de los antiportadores vacuolares Na^+/H^+ del tipo NHX puede ser activada por el complejo SOS3/SOS2 (Qiu *et al.*, 2003). También se ha visto que SOS2 puede activar el antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ vacuolar CAX1, aunque se piensa que en condiciones de estrés salino, SOS2 puede interaccionar con otra proteína de la familia ScaBP, diferente a SOS3, evitando la interacción SOS2/CAX1 (Cheng *et al.*, 2004).

Finalmente se ha propuesto que SOS1 puede funcionar como un sensor de Na^+ e independientemente de la activación por el complejo SOS2/SOS3 (Zhu, 2002, Shabala *et al.*, 2005). Además SOS1 podría directamente regular el transporte de K^+ en la membrana plasmática mediante la inhibición directa de un canal rectificador de salida de K^+ (KORC) o a través de una H^+ -ATPasa (Shabala *et al.*, 2005).

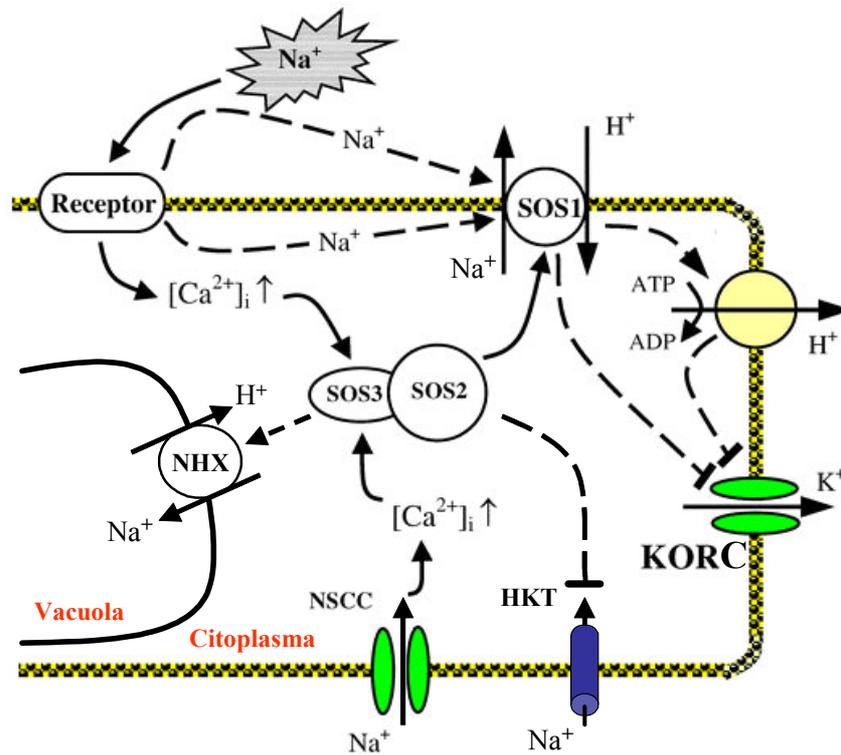


Figura 1.9 Regulación de la homeostasis iónica mediante la vía SOS durante un estrés salino. Líneas continuas indican rutas conocidas, líneas discontinuas indican rutas propuestas. (Chinnusamy *et al.*, 2004; Shabala *et al.*, 2005).

Factores de transcripción

La respuesta al estrés salino requiere de la actividad de factores de transcripción que se unan a secuencias concretas en la región promotora (Figura 1.10) para inducir la transcripción de genes que actuarán para aminorar los síntomas del estrés salino (Xiong, 2002). Las regiones promotoras de estos genes incluyen elementos de respuesta a deshidratación (DREs), elementos de respuesta a ABA (ABREs) y regiones MYCRS/MYBRS, que probablemente participan en la respuesta a la planta al estrés osmótico antes que al efecto específico del Na^+ (Tester y Davenport, 2003); varias proteínas de unión a estos elementos han sido identificadas (Hasegawa *et al.*, 2000, Uno *et al.*, 2000, Zhu, 2002, Mahajan y Tuteja, 2005). La sobreexpresión constitutiva de factores de transcripción genera una expresión constitutiva de genes inducidos por estrés con un incremento en la tolerancia a estreses abióticos (Guo *et al.*, 2004, Kitashiba *et al.*, 2004, Villalobos *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004;). Sin embargo, es posible que esta sobreexpresión constitutiva produzca plantas de reducido tamaño en condiciones normales (Liu *et al.*, 1998), así que estos factores de transcripción se han expresado usando un promotor inducible por estrés mejorando así la inhibición del crecimiento en condiciones normales (Kasuga *et al.*, 1999).

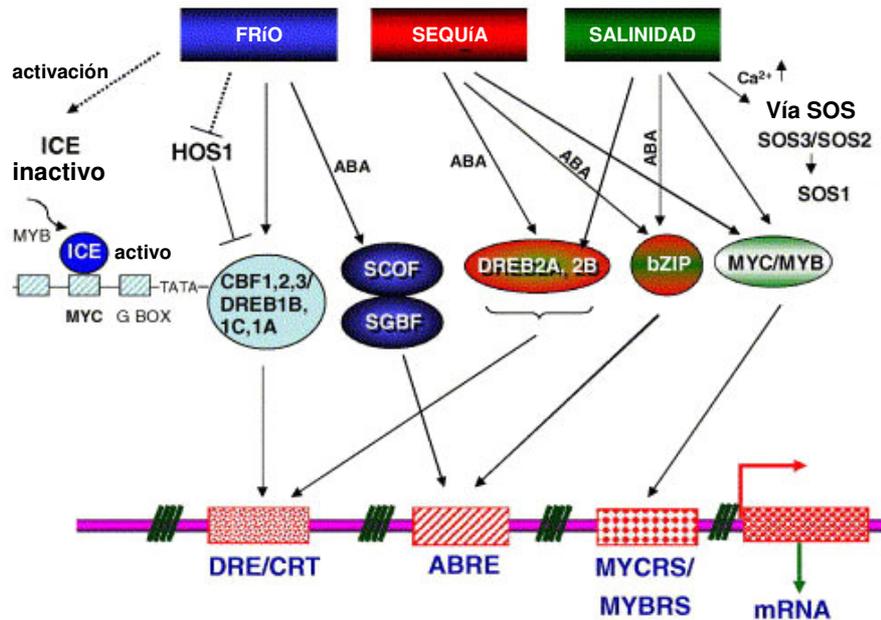


FIGURA 1.10. Diferentes factores de transcripción involucrados en la respuesta a frío, sequía y salinidad. La vía de señalización del estrés osmótico es generada por la sequía y salinidad y es mediada por los factores de transcripción DREB2A, DREB2B, bZIP, MYC y MYB que interactúan con las secuencias DRE/CRT, ABRE o MYCRS/MYBRS de la región promotora de los genes inducidos por estrés (Mahajan y Tuteja, 2005).

1.4.5 Producción de osmolitos

La principal respuesta de las células vegetales a una disminución en el potencial osmótico externo es la síntesis y acumulación de metabolitos llamados osmolitos. Estos osmolitos son pequeñas moléculas neutras que no son tóxicas para la célula a niveles molares, mantienen el balance osmótico de la célula y debido a su carácter hidrofílico pueden sustituir al agua en la superficie de proteínas y membranas para estabilizar su estructura (Hasegawa *et al.*, 2000, Valliyodan y Nguyen, 2006). Son osmolitos los azúcares no reductores (sacarosa, trehalosa, rafinosa, fructanos), azúcar-alcoholes (glicerol, manitol, sorbitol, ononitol), metabolitos anfotéricos (glicina-betaína), aminoácidos (prolina, carnitina, glutamato, ectoína), e incluso los iones K^+ tienen un efecto protector similar a los osmolitos (Hasegawa *et al.*, 2000, Mahajan y Tuteja, 2005, Valliyodan y Nguyen, 2006). La introducción de vías de síntesis de osmolitos en las plantas produce un aumento en la tolerancia a estrés salino (Rathinasabapathi *et al.*, 2000, Garg *et al.*, 2002, Silveira *et al.*, 2003, Yonamine *et al.*, 2004, Waditee *et al.*, 2005).

Se ha observado que una baja concentración de osmolitos también produce un aumento de la tolerancia a estreses abióticos, sin embargo esta baja concentración no podría disminuir el potencial osmótico de la célula y mantener un movimiento de agua y turgencia

adecuado. Por esto se ha planteado que los osmolitos podrían acumularse en tejidos o células específicas de la planta y no en toda la planta, o que sea la ruta metabólica de producción del osmolito más importante que la acumulación *per se* (Hasegawa *et al.*, 2000). Otra explicación sería que los osmolitos estuvieran implicados en la prevención de la producción de radicales de oxígeno y/o en la eliminación de ROS (Noctor y Foyer, 1998, Hasegawa *et al.*, 2000, Xiong y Zhu, 2002).

1.4.6 Respuesta antioxidante en condiciones de estrés salino

Las plantas, en respuesta a la generación de ROS producida por un estrés salino, sintetizan un conjunto de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular como ácido ascórbico, glutatión reducido, tocoferoles y carotenoides; además, aumentan la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT), ascorbato peroxidadas (APX), glutatión S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX) para transformar en compuestos inocuos las ROS (Apse y Blumwald, 2002, Xiong y Zhu, 2002).

El mutante *pst1* de *Arabidopsis*, obtenido de un análisis en busca de mutantes tolerantes a estrés salino, presenta tolerancia a salinidad asociada al incremento de la detoxificación de ROS, ya que este mutante *pst1* presenta una mayor actividad de las enzimas SOD y APX (Tsugane *et al.*, 1999). Del mismo modo, se ha visto que la sobreexpresión en tabaco de un gen con actividades GST y GPX mejora la tolerancia a salinidad de dichas plantas (Roxas *et al.*, 1997, Roxas *et al.*, 2000).

En la especie tolerante a sal *Lycopersicon pennellii* se ha correlacionado su inherente tolerancia a estrés salino y oxidativo con una mayor actividad de SOD y APX (Mittova *et al.*, 2002). Se ha incrementado la tolerancia al estrés salino en arroz sobreexpresando la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) de levadura (Kaminaka *et al.*, 1999). También se ha observado que plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen *ANPI* son más tolerantes a estrés salino y a otros estreses abióticos (Kovtun *et al.*, 2000). *ANPI* codifica una MAPKKK, que forma parte de una cascada de señalización MAPK que incrementa la expresión del gen *GST* en las plantas transgénicas que sobreexpresan *ANPI*. Así que se ha planteado una hipótesis donde la inducción de las enzimas antioxidantes en respuesta a estrés salino y osmótico es mediada por una cascada de señalización MAPK (Chinnusamy *et al.*, 2004).

1.5 El empleo de sistemas modelo en biología molecular

En la investigación biológica, siempre ha sido necesario el uso de sistemas vivos para comprobar o refutar modelos teóricos. En un principio, los investigadores usaban como modelos los organismos, plantas o animales que tenían a mano o eran más manejables; pero con el tiempo, los esfuerzos realizados en un determinado campo de investigación tienden a concentrarse en una especie concreta. Los sistemas modelo no necesariamente deben de ser organismos con interés industrial o agronómico, simplemente son organismos que tienen un conjunto de características apropiadas para dilucidar procesos y mecanismos biológicos. Los sistemas modelo de nuestro tiempo son aquellos organismos con una genómica, biología molecular, genética y bioquímica altamente desarrollada que permite establecer correlaciones entre fenotipos genes y proteínas.

Se ha dicho en reiteradas ocasiones que los organismos usados como sistemas modelo no son útiles para la investigación ya que los conocimientos obtenidos usando estos sistemas (“**ciencia básica**”) muchas veces no son extrapolables a otros organismos y que sería mejor usar organismos de interés industrial o agronómico como sistemas modelo para así aplicar directamente los resultados obtenidos (“**ciencia aplicada**”). La búsqueda y aplicación de características deseables en organismos de interés es importante, pero deja de lado varias preguntas importantes que cualquier investigador serio se plantea: ¿cómo actúa la característica mejorada?, ¿qué mecanismo emplea el organismo para lograr su cometido?, ¿existe una interacción con otros mecanismos o rutas metabólicas?. Y aquí es cuando interviene la ciencia básica, que nos permite responder a las preguntas anteriores y por ende obtener un mayor conocimiento global de lo que está sucediendo lo que nos llevaría a una, muy posible, nueva mejora del organismo de interés.

El aumento de almidón en los tubérculos es importante como fuente de carbohidratos, para ello se puede aumentar la expresión del gen ADP-glucosa pirofosforilasa (*AGP*) y por lo tanto incrementar la cantidad de ADP-glucosa (ADPG), precursor del almidón. Esto es un ejemplo de ciencia aplicada, donde la introducción de un gen produce el incremento en la cantidad de almidón; pero, estudiando los mecanismos de producción de ADPG (ciencia básica) se ha podido descubrir que la producción de ADPG depende de la disponibilidad de sacarosa, la cual entra a la célula por transportadores de sacarosa, entonces sería posible un aumento en la cantidad de almidón regulando la entrada de sacarosa en las células. Este es un ejemplo de cómo la ciencia básica es importante para poder mejorar un organismo de interés

(patata) y no solo un entretenimiento de los investigadores con resultados interesantes pero no aplicables.

1.5.1 *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo

En el estudio de la biología molecular de plantas se ha impuesto el uso de *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo (Meyerowitz, 1989). *Arabidopsis thaliana* es una planta autógena que pertenece a la familia de las crucíferas; aunque no tiene importancia agronómica tiene la ventaja sobre bacterias y levaduras de ser un organismo pluricelular, lo que permite abordar estudios de respuesta integrada frente a un estrés (Zhu, 2000), además presenta una serie de cualidades que la hacen muy apropiada como sistema modelo: un tamaño pequeño (30-40 cm de altura), un ciclo de vida corto (2-3 meses), una elevada producción de semillas (>10000 semillas/planta), un genoma pequeño (125 Mb/haploide), un bajo porcentaje de secuencias repetitivas de DNA (10-15%), facilidad para conseguir mutantes mediante métodos químicos o moleculares, disponibilidad de técnicas de mapeo estandarizadas y eficiente sistema de transformación (Meyerowitz, 1989).

Su empleo como sistema modelo ha contribuido a aumentar el número de marcadores moleculares en su genoma, lo que ha facilitado la tarea de aislar genes mutados. También se han obtenido colecciones de líneas mutantes por inserción de T-DNA, que se encuentran disponibles en centros como el *European Arabidopsis Stock Center* (NASC) y son muy útiles en trabajos de genómica funcional (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Finalmente, *Arabidopsis thaliana* es la primera planta superior cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2006).

1.5.2 Uso de *A. thaliana* en estudios de estrés salino

Como se ha visto en el apartado 1.3.1, las plantas halofitas son más tolerantes a la sal que las plantas glicofitas (donde se incluye *A. thaliana*) por lo que sería más conveniente usar una halofita como modelo en la búsqueda de genes y mecanismos de tolerancia a estrés salino. Actualmente varios grupos emplean una planta halofita llamada *Thellungiella halophila* para el estudio del estrés salino (Inan *et al.*, 2004, Taji *et al.*, 2004, Gong *et al.*, 2005, Vera-Estrella *et al.*, 2005, Wong *et al.*, 2006). *Thellungiella halophila* es una planta nativa de la zona costera del este de China que presenta una morfología y ciclo de vida muy similar a *A. thaliana*, además de ser especies muy relacionadas (>90% de homología en

secuencias de cDNA). Esta halofita presenta 2 características que la pueden convertir en un modelo de estudios de salinidad en un futuro. La primera es que presenta un genoma relativamente pequeño (el doble de *Arabidopsis*) y la segunda es que puede ser transformada por inmersión floral (Bent, 2000), lo que permite la obtención de mutantes insercionales de T-DNA y la posterior identificación y clonación de genes relacionados con la tolerancia a salinidad (Zhu, 2001).

Dado que *A. thaliana* es una planta glicofita sensible al daño producido por la salinidad se podría inferir que no es un organismo modelo adecuado para el estudio de mecanismos de tolerancia a salinidad. Sin embargo, investigaciones realizadas con plantas y suspensiones celulares de tabaco y alfalfa establecieron que las glicofitas también son capaces de adaptarse al estrés salino, siempre y cuando dicho estrés ocurra de un modo paulatino y con incrementos moderados (Xiong y Zhu 2002). Se puede concluir que las glicofitas tienen en su genoma genes para la tolerancia a la salinidad, aunque no funcionan de forma eficaz sin una adaptación previa y que todas las especies vegetales poseen cierto grado de tolerancia al estrés salino junto con una conservación de los elementos adaptativos claves entre halofitas y glicofitas. En resumen, las diferencias en la tolerancia a estrés salino entre halofitas y glicofitas parecen ser cuantitativas más que cualitativas. Esto hace que el trabajo con *Arabidopsis* sea tan válido como con cualquier planta halofita (Xiong y Zhu, 2002).

1.5.3 Estrategias para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a estrés salino en *Arabidopsis thaliana*

Existen diversas estrategias empleadas para identificar genes involucrados en el estrés salino que se pueden agrupar en 3 clases: bioquímicas, basadas en el perfil de expresión y genéticas (Xiong y Zhu, 2002).

La estrategia bioquímica se basa en un conocimiento previo de una enzima en particular o ruta metabólica que es importante en la tolerancia a la salinidad donde los genes de interés son sobreexpresados y/o mutados y se analizan los fenotipos de la planta transgénica; este tipo de análisis se conoce como **genética reversa**. Mediante esta estrategia se han caracterizado en *Arabidopsis* los genes *HKT1* (Uozumi *et al.*, 2000), *NHX1* (Apse *et al.*, 1999), el sensor de calcio CBL1 que regula la respuesta a NaCl (Cheong *et al.*, 2003) y la flavoproteína Hal3 (Espinosa-Ruiz *et al.*, 1999).

La estrategia del perfil de expresión genético se basa en comparar el nivel de expresión de los genes en condiciones de estrés salino con su nivel de expresión en ausencia de estrés. Los genes que muestran o bien una activación o una represión en condiciones de estrés son clonados para su posterior análisis. Un inconveniente de esta técnica es que varios genes críticos para la tolerancia a salinidad de la planta no son inducidos por estrés salino; además, varios de los genes inducidos pueden no ser importantes en la tolerancia a salinidad y ser solo artefactos que están presentes como consecuencia de un daño general en la planta (Xiong y Zhu, 2002). Actualmente se emplea la técnica de los **micromatrices** para el análisis de la expresión de genes a gran escala.

Por último, la estrategia genética utiliza la variación natural o inducida que presentan las plantas de *Arabidopsis* y que les confiere tolerancia al estrés salino. Esta estrategia se basa en encontrar primero el fenotipo deseado y luego determinar el gen o ruta involucrado, este tipo de abordaje se conoce como **genética directa**. Una mutación genética puede ser creada usando agentes mutágenos como el etil metano sulfonato (EMS), rayos ultravioleta, transposones y T-DNA. La mutación de los genes involucrados en la tolerancia a salinidad producirá plantas con menor tolerancia que las plantas silvestres (a menos que el gen mutado sea funcionalmente redundante), este es el caso de los mutantes *sos* que fueron aislados por su hipersensibilidad a NaCl (Wu *et al.*, 1996). También es posible encontrar mutantes con aumento de la tolerancia a salinidad, como en el caso de los mutantes del gen *ABA2* (Quesada *et al.*, 2000, González-Guzmán *et al.*, 2002) que fueron aislados por su tolerancia a NaCl. Es importante mencionar también el empleo de genes delatores bajo el control de promotores inducibles por estrés para la identificación de reguladores negativos, que al ser mutados producirán un fenotipo de tolerancia a salinidad, como el caso de *FRY1/SAL1* (Xiong *et al.*, 2001).

Finalmente, es necesario señalar que pueden ser aplicadas otras estrategias, como la complementación en levaduras de una biblioteca de cDNAs de *Arabidopsis*, siendo obtenidos por este método los factores de transcripción STO y STZ (Lippuner *et al.*, 1996), la MAP quinasa quinasa MKK2 (Teige *et al.*, 2004) y dos proteínas de “splicing” *AtRCY1* y *AtSRL1* (Forment *et al.*, 2002).

1.5.4 Activación transcripcional en *Arabidopsis thaliana*

Uno de los agentes mutágenos más empleados es el EMS, pero las líneas obtenidas con este mutágeno presentan varios inconvenientes para un análisis funcional rápido y completo. El EMS no produce una sola mutación puntual, sino que produce decenas de mutaciones a lo largo de todo el genoma; además, generalmente las mutaciones por EMS son recesivas y el único modo de aislar el gen mutado es mediante un mapeo posicional, técnica que resulta larga y laboriosa. La mutagénesis insercional por T-DNA se emplea como una mejor alternativa al uso de EMS, ya que la introducción de T-DNA mediante *A. tumefaciens* en la planta genera una o pocas inserciones en el genoma, además, el gen mutado queda “marcado” por el T-DNA y es más fácil su posterior localización en el genoma. Pero existe una gran desventaja: las mutaciones generadas siguen siendo en su mayoría recesivas (pérdida de función); la mutación por pérdida de función presenta limitaciones al realizar un rastreo, ya que si existe una redundancia génica (dos o más genes con funciones similares llamados homólogos), una pérdida de función en un gen de interés no se detectaría porque puede ser reemplazada por otro gen homólogo. También puede darse el caso de que la pérdida de función de un gen resulte letal, por lo que no sea posible el análisis del mutante resultante y por tanto identificar la función de dicho gen.

La **activación transcripcional** es una técnica de mutagénesis insercional por T-DNA que permite obtener mutantes dominantes (ganancia de función). Esta técnica está basada en la inserción en el genoma de *Arabidopsis* de un T-DNA que contiene repeticiones en tándem del activador transcripcional 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), así, los activadores transcripcionales, presentes en el T-DNA, incrementaran la expresión de los genes adyacentes al lugar donde esta insertado el T-DNA en el genoma (Weigel *et al.*, 2000). Esta técnica ha permitido obtener varios mutantes dominantes por incremento en la expresión génica (Ito y Meyerovitz, 2000, Borevitz *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2002, Schomburg *et al.*, 2003, Xia *et al.*, 2004, Ward *et al.*, 2005, Koch *et al.*, 2006). Lo ideal es tener la inserción del T-DNA en una región intergénica; aunque, el T-DNA con los activadores transcripcionales puede insertarse en medio de un gen, interrumpiéndolo, lo que generaría mutaciones recesivas y de pérdida de función.

1.6 Policones como herramientas para dilucidar los mecanismos de la tolerancia al estrés salino

Como se ha visto en los apartados anteriores, existe una gran variedad de canales y transportadores involucrados en la homeostasis iónica, donde se incluyen además los transportadores y canales de K^+ , los cuales son revisados en el apartado 1.8. Es importante hacer notar que estos transportadores y canales de iones trabajan bajo el control de proteínas y/o cascadas de señalización variadas, por lo que su actividad puede estar regulada por uno o varios estreses (sequía, frío, salinidad, calor, etc.). Así que desde que el “sensor siente el estrés” hasta que se produce la respuesta adecuada, se deben activar una serie de rutas de señalización, perfectamente coordinadas. Como vemos, no solo la gran cantidad de canales y transportadores involucrados en la homeostasis iónica es ya de por sí una complicación para conocer la función e importancia de cada uno, sino que además la implicación de cascadas de señalización (donde se incluyen “sensores de estrés”, segundos mensajeros, proteínas quinasas y fosfatasas y factores de transcripción) hace aún más difícil la dilucidación de los mecanismos de tolerancia a estreses abióticos. En el caso de la salinidad, existe un problema adicional, ya que a las cascadas de señalización activadas por el efecto tóxico del Na^+ , hay que añadir las cascadas de señalización activadas por el efecto osmótico.

La manera más simple de encontrar genes implicados en la tolerancia a la salinidad consiste en realizar un rastreo de una colección de mutantes en un medio con una alta concentración de NaCl y así poder obtener individuos que sean capaces de germinar y/o crecer en estas condiciones. Este planteamiento se ha llevado a cabo en 3 experimentos independientes, para los cuales se emplearon colecciones de semillas de *Arabidopsis thaliana* mutagenizadas, donde se obtuvieron 4 mutantes *ser* (salt resistant) capaces de germinar en 200 mM de NaCl (González-Guzmán *et al.*, 2002, González-Guzmán *et al.*, 2004), 17 mutantes *sañ* (salobreño) que germinan en medio con 250 mM de NaCl (Quesada *et al.*, 2000) y 1 mutante *sto* (salt tolerant) capaz de germinar en 145 mM NaCl (Ruggiero *et al.*, 2004). Como se ha mencionado, estos mutantes fueron aislados por su capacidad de tolerar altas concentraciones de NaCl, por lo que en un primer momento se pensó que podían estar involucrados en la tolerancia al estrés iónico, pero análisis posteriores permitieron descubrir que casi todos estos mutantes, aislados en un medio con alta concentración de NaCl, eran tolerantes al estrés osmótico y no al estrés iónico *per se*.

De hecho, los análisis de complementación revelaron que los mutantes *sre1-1*, *sre1-2*, *sañ3-1* y *sañ3-2* son alelos del gen *ABA2*, implicado en la biosíntesis de ácido abscísico (González-Guzmán *et al.*, 2002) y que los mutantes *sre2-1* y *sre2-2* son alelos del gen *AAO3*, enzima que cataliza el paso final de la síntesis de ácido abscísico (González-Guzmán *et al.*, 2004). Un mapeo posicional permitió determinar que el mutante *sañ5* es un alelo del gen *ABI4*, implicado en la trasducción de señal de ABA (Quesada *et al.*, 2000) y un análisis de TAIL-PCR permitió descubrir que el mutante *sto1* es un alelo del gen *NCED3*, gen implicado también en la síntesis de ácido abscísico (Ruggiero *et al.*, 2004).

En estos experimentos, donde se usa una alta concentración de NaCl, se produce un estrés iónico y un estrés osmótico que inhiben la germinación de las semillas. Los mutantes *sre*, *sañ* y *sto* son incapaces de percibir el estrés osmótico, ya que se conoce que la percepción de la señal por estrés osmótico tiene como elemento principal al ABA (Xiong *et al.*, 2002), y por tanto, estos mutantes son capaces de germinar en presencia de sal. De este modo, los mutantes en la síntesis o señalización de ABA son los candidatos más probables para ser identificados en análisis genéticos de germinación realizados en medios con alto NaCl.

Para evitar la aparición de candidatos tolerantes al estrés osmótico cuando se realiza un análisis genético en busca de mutantes resistentes al estrés salino, se debería plantear la búsqueda de mutantes sensibles a dicho estrés, ya que en este caso la cantidad de NaCl, empleada en el medio de selección, es mucho menor. Este planteamiento se realizó para la obtención de los genes de la vía SOS en *Arabidopsis* (Wu *et al.*, 1996) y los mutantes *tss* de tomate (Borsani *et al.*, 2001), aunque en el caso de los mutantes *tss*, se observó que el mutante *tss2* es un regulador negativo de la señalización mediada por ABA (Borsani *et al.*, 2001, Rosado *et al.*, 2006). Esto puede deberse a que para encontrar individuos de tomate sensibles a NaCl, se usa una concentración alta de NaCl, que puede crear un efecto osmótico.

Si el principal problema de usar NaCl en la búsqueda de genes involucrados en la toxicidad iónica es la alta concentración de NaCl necesaria (lo cual provocaría la aparición del efecto osmótico), deberían utilizarse otros cationes que sean tóxicos para la planta a concentraciones mucho menores que el Na⁺. Un catión que cumple este requisito es el litio, el Li⁺ es un análogo del Na⁺ pero mucho más tóxico por lo que se puede usar una menor cantidad para producir una toxicidad iónica (20-25 mM). El Li⁺ ha sido usado como agente de selección para encontrar mutantes resistentes en *Arabidopsis* (Niñoles, 2005) y levaduras (Goossens *et al.*, 2000, Forment *et al.*, 2002). También es posible el uso de policationes como

las poliaminas (espermina, espermidina, putrescina) para encontrar mutantes tolerantes al estrés salino, ya que las poliaminas son muy tóxicas a concentraciones bajas. En *Arabidopsis*, existe solo un trabajo donde se empleó una poliamina como agente de selección para seleccionar mutantes resistentes, en este caso se empleo 0,35 mM de espermina y se obtuvieron 14 mutantes tolerantes a espermina pero que no presentaban fenotipo a espermidina o putrescina (Mirza y Iqbal, 1997). En levaduras se han identificado genes de la regulación del transporte de poliaminas y la homeostasis iónica usando espermina (Kakinuma *et al.*, 1995, Erez y Kahana, 2001).

En esta tesis se ha propuesto el uso de noespermidina como agente de selección para obtener mutantes resistentes que permitan descubrir genes relacionados con la homeostasis iónica. La noespermidina ($C_6H_{17}N_3$) es una poliamina que se encuentra en bacterias termófilas (Hamana *et al.*, 2001, Hamana y Itoh, 2001), microalgas (Hamana, 2004) y la familia de protobacterias *Vibrionaceae* (Hamana, 1997). Esta poliamina no se encuentra de forma natural en organismos eucariotas e inhibe la germinación de *Arabidopsis* a muy baja concentración (~3 mM). La utilidad de poliaminas no presentes en eucariotas o análogos tóxicos de poliaminas, para encontrar proteínas involucradas en el mecanismo de transporte de cationes y policationes ha sido demostrada en levaduras (Kaouass *et al.*, 1997).

1.7 Sistemas de transporte de iones a través de las membranas vegetales

Una característica importante de las células vivas es su capacidad de mantener en su interior iones y moléculas a concentraciones fuera del equilibrio. Esta característica se debe a las propiedades estructurales y funcionales de la membrana plasmática, que contiene distintos tipos de proteínas las cuales permiten la entrada y salida de iones, así como la entrada de nutrientes y salida de sustancias tóxicas. Pero no todos los iones se transportan a través de la membrana plasmática de la misma forma o mediante el mismo tipo de proteína.

Un ion se mueve de forma pasiva si lo hace a favor de la fuerza física que actúa sobre él, de la misma forma, un ion es transportado de forma activa si su movimiento se realiza en contra de dicha fuerza, para lo cual las células vivas emplean energía metabólica. Dicha fuerza física se denomina **fuerza ion motriz** que consiste en la diferencia entre el **potencial de membrana** de las células y el **potencial de Nernst** para el ion involucrado en el transporte.

La energía asociada a un ion (j) depende de su concentración (C_j) y las condiciones eléctricas donde se encuentre (ψ); la suma de estos dos componentes se denomina **potencial electroquímico** ($\tilde{\mu}_j$) y cuantifica la capacidad de trabajo que un ion posee:

$$\tilde{\mu}_j = \tilde{\mu}_j^* + RT \ln C_j + zF \psi$$

donde $\tilde{\mu}_j^*$ es el potencial químico en condiciones estándar, R es la constante de la ecuación general de los gases, T es la temperatura absoluta en grados °K, z es la carga del ion, F es la constante de Faraday y ψ es el campo eléctrico donde el ion se encuentra.

En los sistema vivos, la mayoría de los iones no está en equilibrio y la magnitud de este desequilibrio se puede calcular a partir de la diferencia de **potencial electroquímico** del ion en los dos compartimentos considerados “e” e “i”. El **gradiente de potencial electroquímico** o **fuerza ion motriz** sería la diferencia entre ambos compartimentos:

$$\Delta\tilde{\mu}_j = [\tilde{\mu}_j^* + RT \ln C_j^i + zF \psi^i] - [\tilde{\mu}_j^* + RT \ln C_j^e + zF \psi^e]$$

Agrupando los términos eléctricos y de concentración, se obtiene:

$$\Delta\tilde{\mu}_j = [zF(\psi^i - \psi^e)] - [RT \ln C_j^e / C_j^i]$$

así finalmente, la ecuación quedaría:

$$\Delta\tilde{\mu}_j/F = z(E_m - E_j^N) \quad \text{donde } E_j^N = RT/zF \ln C_j^e / C_j^i \text{ (ecuación de Nernst)}$$

donde $\psi^i - \psi^e$ es la diferencia de potencial eléctrico que existe entre ambos compartimentos o **potencial de membrana** (E_m) y E_j^N es el potencial de membrana con el cual el ion “ j ” estaría en equilibrio, también llamado **potencial de Nernst**.

El gradiente de potencial electroquímico o fuerza motriz es expresado en mV. Para un catión monovalente, si E_m es más negativo que E_j^N , la fuerza ion motriz es negativa y el ion tiende a entrar en el compartimento “i”. En cambio, si E_j^N es más negativo que E_m , la fuerza motriz es positiva, el ion se acumula en “i” por encima de su valor de equilibrio y la fuerza física que lo empuja se dirige hacia fuera. Finalmente tenemos que cuando E_j^N y E_m son iguales, el gradiente de potencial electroquímico es cero y el ion esta en equilibrio (Figura 1.11).

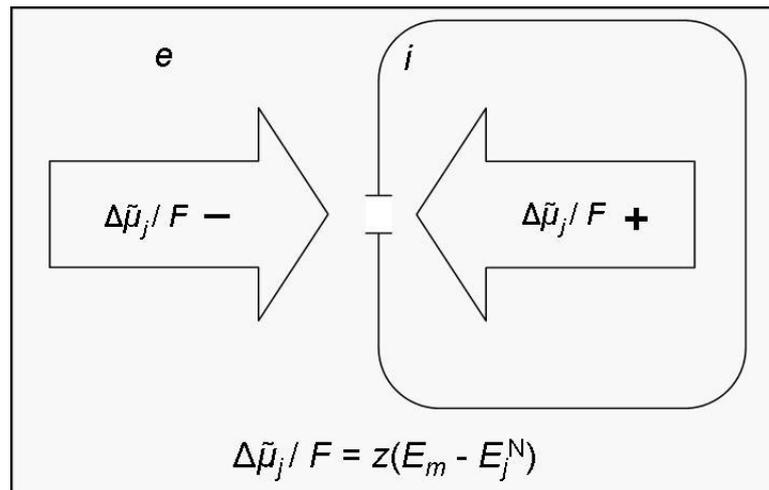


FIGURA 1.11 Gradiente de potencial electroquímico o fuerza ion motriz para un ion “j”. Cuando esta variable adquiere un valor positivo, el ion esta sometido a una fuerza física que tiende a sacarlo del compartimento “i”. Cuando tiene valor negativo, el ion se ve empujado a entrar en “i” (Fernández y Maldonado, 2000).

1.7.1 Transporte pasivo de iones

El **transporte pasivo** se produce a favor del gradiente de potencial electroquímico, esto implica que el ion tiende a acumularse en las células en una concentración próxima al equilibrio para un E_m dado. La razón de ello es que el transporte pasivo trata de igualar el potencial de Nernst (E_j^N) del ion que se mueve con el potencial de membrana (E_m)

- **Canales de iones.** Son proteínas transmembrana que funcionan como poros selectivos de iones. El tamaño del poro y la densidad de cargas sobre su superficie interior determinan su especificidad de transporte, este transporte de iones es siempre pasivo, la dirección del flujo de un ion en particular es dictada únicamente por el gradiente de potencial electroquímico ($\Delta\tilde{\mu}_j/F$) del ion y limitado mayormente a iones (Taiz y Zeiger, 2002). Los canales de iones no solo están presentes en la membrana plasmática sino también en el tonoplasto, retículo endoplasmático, mitocondria, membrana interna del cloroplasto y

membrana tilacoidal. Estos canales no se encuentran abiertos todo el tiempo, sino que presentan una estructura llamada “gate” (puerta) que abre y cierra el poro en respuesta a señales externas como cambios en el potencial de membrana, pH, concentraciones de Ca^{2+} , hormonas y luz (Taiz y Zeiger, 2002).

La permeabilidad de una membrana para un determinado ion es variable y depende del número de canales, su conductancia y su actividad o “gating” (Fernández y Maldonado, 2000). Así tenemos que los canales de aniones solo permiten la salida de aniones de la célula o entrada en vacuola; los canales de calcio funcionan solo en la dirección de entrada de Ca^{2+} al citosol. La excepción es el K^+ que puede difundir hacia dentro o hacia fuera de la célula dependiendo de si el potencial de membrana es más negativo o más positivo, respectivamente, que E_K^N (potencial de equilibrio del K^+). Además, a diferencia de los canales de K^+ de células animales, los de plantas son permeables a un gran número de cationes monovalentes; por ejemplo en *Nitella*, en orden decreciente, los canales de K^+ son permeables a Rb^+ , NH_4^+ , Na^+ , Li^+ y Cs^+ (Fernández y Maldonado, 2000).

1.7.2 Transporte activo de iones

En el **transporte activo**, el ion se mueve en sentido contrario al gradiente de potencial electroquímico. La existencia de este tipo de transporte es esencial para las células, ya que para el correcto funcionamiento de las rutas metabólicas, se necesitan concentraciones internas de iones muy por encima o muy por debajo de la concentración de equilibrio. Se distinguen dos tipos de sistemas en función de la energía que utilizan para realizar el transporte; en el primero, los **transportadores primarios o bombas** realizan el transporte de iones consumiendo energía metabólica (ATP o PP_i); en el segundo, los **transportadores secundarios** o sistemas de cotransporte utilizan principalmente H^+ , acumulado en la membrana por la actividad de las bombas primarias, para impulsar los iones en contra de su gradiente de potencial electroquímico.

- **Bombas primarias** Son proteínas de membrana que mueven iones (masa y carga) en contra de su gradiente de potencial electroquímico utilizando energía metabólica para generar gradientes de concentración y eléctricos (Fernández y Maldonado, 2000). En las células vegetales, la bomba primaria que energiza la membrana plasmática es la H^+ -ATPasa, una bomba de protones que genera un gradiente de H^+ a través de la

membrana consumiendo ATP. La H⁺-ATPasa es una bomba electrogénica ya que el transporte de H⁺ genera un movimiento neto de cargas a través de la membrana, generando un déficit de cargas positivas en el citoplasma y un potencial de membrana muy negativo (-100 a -200 mV) (Maathuis y Sanders, 1999, Serrano y Rodríguez Navarro, 2001).

En el tonoplasto se ubican dos bombas de H⁺ electrogénicas: la H⁺-ATPasa de vacuola, que difiere de la de membrana plasmática en su estructura, mecanismo de acción y en su relación con los inhibidores, y la pirofosfatasa H⁺-PP_iasa vacuolar que usa pirofosfato (PP_i) como fuente de energía (Fernández y Maldonado, 2000).

- **Transportadores secundarios** Al gradiente de potencial electroquímico para H⁺ ($\Delta\tilde{\mu}_H/F$), generado por las bombas primarias, se le conoce como **fuerza protón motriz (Δp)**, que representa la energía libre guardada en forma de gradiente de H⁺ y que impulsará el transporte activo secundario en la célula vegetal (Fernández y Maldonado, 2000, Taiz y Zeiger, 2002). Así, para que el proceso de transporte sea termodinámicamente posible es necesario que Δp supere, en valor absoluto, al gradiente de potencial electroquímico del soluto.

Según el sentido del movimiento del soluto que se transporta, se distinguen dos tipos de transporte secundario: el simporte, donde ambos compuestos se mueven en el mismo sentido y el antiporte, en donde los compuestos se mueven en sentido contrario (Fernández y Maldonado, 2000, Taiz y Zeiger, 2002). Los sistemas de simporte suelen mediar la incorporación de nutrientes y aniones, mientras los sistemas de antiporte median la salida o compartimentación en vacuola de iones.

1.8 Mecanismos de transporte de potasio

De acuerdo a los primeros trabajos de Epstein, en plantas existen 2 mecanismos de incorporación de K⁺ a las células, llamados sistemas de alta y baja afinidad (Epstein *et al.*, 1963). En este modelo de incorporación bifásica de K⁺, el sistema de alta afinidad se conoce como mecanismo I y ha sido convencionalmente atribuido a la actividad de transportadores. Este mecanismo se satura con una concentración de K⁺ en el rango micromolar, es altamente selectivo para K⁺ y lo introduce en el citoplasma en contra de su gradiente de potencial electroquímico (Maathuis y Sanders, 1994, Very y Sentenac, 2003). El sistema de baja

afinidad o mecanismo II es un sistema pasivo de adquisición de K^+ que se ha asociado a la actividad de canales. La saturación de este mecanismo no depende de las concentraciones externas de K^+ , muestra una baja selectividad por K^+ y es específicamente inhibido por bloqueadores de canales de K^+ (Maathuis y Sanders, 1993). Es posible que el mecanismo I sea la vía dominante para la incorporación de K^+ cuando la concentración extracelular no excede de 1 mM y que el mecanismo II constituya el modo principal de toma de K^+ cuando su concentración es mayor de 0,5 mM.

Trabajos recientes han demostrado que la función de las proteínas encargadas del transporte de K^+ es muy diversa, y en términos de la incorporación de K^+ , las diferencias entre transportadores y canales no están bien definidas ya que existen evidencias de que un único transportador puede ser el responsable de la incorporación bifásica de K^+ (Fu y Luan, 1998, Kim *et al.*, 1998); así también, los mecanismos de baja y alta afinidad varían según existan condiciones de deficiencia o suficiencia de K^+ (Benlloch *et al.*, 1989). También se ha demostrado la implicación de canales en el transporte de alta afinidad de K^+ como es el caso de AKT1 en raíces (Hirsch *et al.*, 1998, Spalding *et al.*, 1999) y SPIK en polen (Mouline *et al.*, 2002). Finalmente algunos transportadores del tipo HAK emplean un mecanismo de transporte de K^+ de alta afinidad, mientras otros actúan mediante un mecanismo de transporte de K^+ de baja afinidad (Senn *et al.*, 2001).

1.8.1 Canales de K^+

Los canales de K^+ han sido ampliamente estudiados debido a su fácil expresión en sistemas heterólogos (oocitos de *Xenopus*, células animales y levaduras) y al empleo de técnicas electrofisiológicas avanzadas (“patch clamping”). En plantas, los canales de K^+ pueden ser divididos en 4 grupos (Figura 1.12) dependiendo de su estructura (Very y Sentenac, 2002, Very y Sentenac, 2003, Ashley *et al.*, 2006). Estos 4 grupos son: canales tipo “shaker”, canales de 2 poros (KCO-2P/TPK), canales de un poro (KCO-1P) y canales de tipo CNGC.

Canales tipo “Shaker”

Los canales tipo “Shaker” de plantas tienen similitud a nivel de secuencia y estructura con los canales de K^+ sensibles a voltaje de animales y forman la llamada familia “Shaker” (Jan y Jan, 1997). Los canales “Shaker” de animales están formados por 4 subunidades ordenadas alrededor de un poro central; cada subunidad presenta una zona hidrofóbica

formada por 6 segmentos transmembrana (TMS) donde el cuarto segmento actúa como un sensor de voltaje y el 5° segmento forma la pared del canal. Entre el 5° y 6° segmento existe una región altamente conservada llamada dominio P (poro) por donde entra el K^+ (Figura 1.12), esta región contiene el motivo TxxTxGYGD que determina la selectividad a K^+ de estos canales (Jan y Jan, 1997). En la región C-terminal existen dominios de regulación como el dominio de unión de nucleótidos cíclicos (CNBD), el dominio ankirina (Anky) presente en la mayoría de los canales y que se ha propuesto como sitio de interacción con proteínas reguladoras (Sentenac *et al.*, 1992) y la región KHA (rica en residuos hidrofóbicos y ácidos) que puede estar envuelta en la tetramerización de la subunidad y/o el agrupamiento de canales en la membrana (Daram *et al.*, 1997, Ehrhardt *et al.*, 1997).

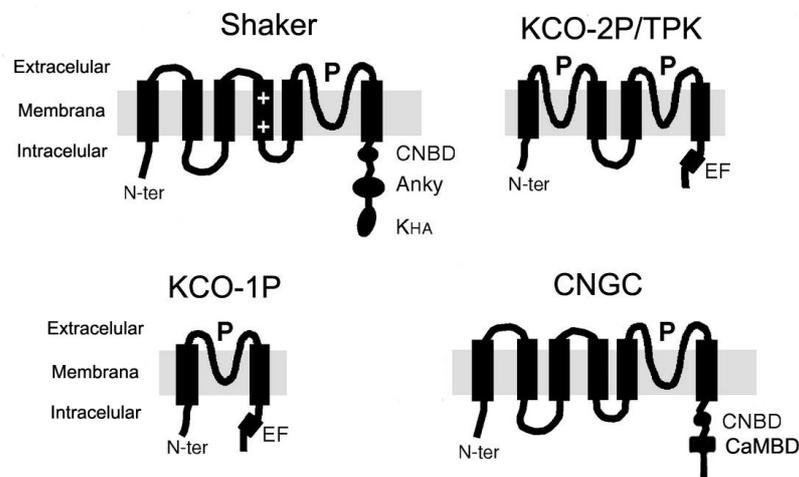


Figura 1.12 Estructura de los canales de K^+ identificados en plantas. Los modelos propuestos para los 4 grupos de canales de K^+ identificados en plantas: “Shaker”, KCO-2P/TPK, KCO-1P y CNGC son derivados de los propuestos para animales y bacterias como “Shaker” (Jan y Jan, 1997), KCNK (Patel y Honoré, 2001), Kir (Doupnik *et al.*, 1995) y CNGC (Finn *et al.*, 1996), respectivamente. La topología propuesta está solo basada en los perfiles de hidrofobicidad. ++ (aminoácidos cargados positivamente en el sensor de voltaje), CNBD (dominio de unión de nucleótidos cíclicos), Anky (dominio ankirina), KHA (dominio KHA), CaMBD (dominio de unión de calmodulina), EF (dominio del tipo “EF hands”) y P (poro).

Los canales “Shaker” son canales selectivos de K^+ fuertemente regulados por el voltaje, así que estos canales pueden ser reagrupados en 3 subfamilias de acuerdo al rango de voltaje en que están activos y a sus propiedades de rectificación. Estas subfamilias son: canales rectificadores de entrada (IRKs), canales rectificadores de salida (ORKs) y canales rectificadores de salida débiles (WIRKs).

- **Canales rectificadores de entrada (IRKs):** Son activados por la hiperpolarización de la membrana y están involucrados en la entrada de K^+ a la célula (Very y Sentenac, 2003). Estos canales no se inactivan aunque persista la hiperpolarización, por lo que pueden

mediar la entrada de K^+ a largo plazo; además la activación de estos canales es independiente de la concentración exterior de K^+ y presentan una alta selectividad K^+/Na^+ (Very y Sentenac, 2002). En *Arabidopsis* existen 4 miembros de esta subfamilia: AKT1, KAT1, KAT2 y SPIK.

AKT1 (Sentenac *et al.*, 1992) se expresa en el córtex y en la epidermis radicular, esta involucrado directamente en la nutrición mineral por ser el principal sistema de toma de K^+ en *Arabidopsis* (Lagarde *et al.*, 1996, Hirsch *et al.*, 1998, Ashley *et al.*, 2006). Analizando un mutante *akt1* se ha demostrado que AKT1 forma parte del sistema de toma de K^+ insensible a NH_4^+ ; además, este canal permite el transporte de K^+ en un rango muy amplio de concentraciones de K^+ , incluso del orden micromolar (Hirsch *et al.*, 1998, Spalding *et al.*, 1999). También está descrito que AKT1 contribuye a la toma de K^+ en las células del mesófilo (Dennison *et al.*, 2001) y a la formación de pelos radiculares (Desbrosses *et al.*, 2003).

KAT1 (Anderson *et al.*, 1992) y KAT2 (Pilot *et al.*, 2001) están implicados en la entrada de K^+ en las células oclusivas y la regulación de la apertura de los estomas, además de la carga del floema (Nakamura *et al.*, 1995, Very y Sentenac, 2003). Es importante mencionar que KAT1 y KAT2 pueden interaccionar y formar canales heteromultiméricos (Pilot *et al.*, 2001), pero el mutante de pérdida de función *KAT1::En-1* no presenta problemas en la apertura estomática ni en la entrada de K^+ en las células oclusivas, por lo que KAT1 no es esencial para la apertura de los estomas probablemente debido a la presencia de otros rectificadores de entrada de K^+ en las células oclusivas (Pilot *et al.*, 2001, Szyroki *et al.*, 2001). Finalmente hay que destacar que KAT1 y KAT2 pueden estar involucrados en la elongación y división celular, respectivamente (Philippart *et al.*, 2004).

Otro miembro de esta subfamilia es SPIK (Mouline *et al.*, 2002) que está involucrado en la toma de K^+ en el polen y es requerido para el normal desarrollo del tubo polínico y de la capacidad polinizadora del polen (Mouline *et al.*, 2002).

El número de representantes de la familia “Shaker” en plantas es considerable, por ejemplo ortólogos de AKT1 han sido identificados en patata SKT1 (Zimmermann *et al.*, 1998), trigo TaAKT1 (Buschmann *et al.*, 2000), tomate LKT1 (Hartje *et al.*, 2000) y arroz OsAKT1 (Golldack *et al.*, 2003) entre otras especies. Además, se han caracterizado

representantes de KAT en patata KST1 (Zimmermann *et al.*, 1998), en zanahoria KDC1 (Downey *et al.*, 2000) y en uva SIRK (Pratelli *et al.*, 2002).

- **Canales rectificadores de salida (ORKs):** Son activados por depolarización de la membrana y median la salida de K^+ de la célula (Very y Sentenac, 2003). La activación de estos canales es dependiente de K^+ y presenta una alta selectividad K^+/Na^+ . Por otro lado, cuando existen altas concentraciones de Ca^{2+} externo, los ORKs pueden mediar la entrada de Ca^{2+} (Very y Sentenac, 2002). En *Arabidopsis* existen 2 miembros de esta subfamilia: SKOR y GORK.

SKOR (Gaymard *et al.*, 1998) se localiza en el periciclo de la raíz y en las células de la estela que rodean el xilema y está involucrado en la carga de K^+ en el xilema. Esto se ha demostrado en base a que el mutante *skor* muestra un bajo nivel de traslocación de K^+ de la raíz a la parte aérea (Gaymard *et al.*, 1998, Pilot *et al.*, 2003). GORK (Ache *et al.*, 2000) se localiza en las células oclusivas donde permite la salida de K^+ durante el cierre de los estomas (Ache *et al.*, 2000, Hosy *et al.*, 2003), también se encuentra en pelos radiculares, donde permite la salida de K^+ para repolarizar el potencial de membrana en respuesta a estímulos externos (Ivashikina *et al.*, 2001). Se ha identificado un ortólogo de SKOR y GORK en *Samanea saman* llamado SPORK (Moshelion *et al.*, 2002), además de 2 ortólogos de SKOR en *Thlaspi arvense* y *Thlaspi caerulescens* (Piñeros y Kochian, 2003).

- **Canales de salida con débil rectificación (WIRKs):** Son activados por la hiperpolarización de la membrana pero es posible que en condiciones normales de potencial de membrana sean funcionales, también son potencialmente capaces de mediar la entrada y salida de K^+ , mostrando una alta selectividad K^+/Na^+ (Very y Sentenac, 2002, Very y Sentenac, 2003). Existe un miembro de esta subfamilia: AKT2/AKT3.

AKT2/AKT3 (Cao *et al.*, 1995, Marten *et al.*, 1999) son dos transcritos de un mismo gen que se encuentran en el parénquima del floema y xilema y en las células del mesófilo (Marten *et al.*, 1999, Lacombe *et al.*, 2000b). Estos canales pueden estar involucrados en el transporte a larga distancia a través de la carga y/o descarga de K^+ en el floema (Marten *et al.*, 1999, Lacombe *et al.*, 2000b, Deeken *et al.*, 2002), en la permeabilidad de las células del mesófilo (Dennison *et al.*, 2001) y en la entrada de K^+ en las células oclusivas (Ivashikina *et al.*, 2005). También se ha demostrado que AKT2 interactúa físicamente con AKT1 y KAT2 (Pilot *et al.*, 2003, Xicluna *et al.*, 2007).

Por último, un miembro importante de la familia “Shaker” es AtKC1 (Reintanz *et al.*, 2002) que se expresa en raíz, pelos radiculares, hojas, tricomas e hidátodos (Ivashikina *et al.*, 2001, Pilot *et al.*, 2003) pero no forma un canal de iones funcional cuando es expresado en sistemas heterólogos, aunque su pérdida de función afecta las propiedades biofísicas de AKT1 en los pelos radiculares (Dreyer *et al.*, 1997, Reintanz *et al.*, 2002), por lo que se ha propuesto que AtKC1 interacciona físicamente con AKT1 al igual que con AKT2 (Pilot *et al.*, 2003, Obrdlik *et al.*, 2004).

Canales de 2 poros (KCO-2P/TPK)

Los canales KCO-2P fueron llamados así en principio por ser canales de salida de K⁺ con 2 poros, pero recientemente se ha comprobado que algunos miembros de esta familia no actúan como rectificadores de salida por lo que se propuso el cambio de la nomenclatura a TPK (Becker *et al.*, 2004). Los canales TPK presentan una región hidrofóbica compuesta por 4 TMS (Figura 1.12) y 2 dominios P (poro). Cuando estos canales están activos, su actividad no varía con el voltaje, ya que no presentan un TMS que actúe como sensor de voltaje (Very y Sentenac, 2002). El poro contiene un motivo que determina la alta selectividad de K⁺ y la mayoría de ellos poseen posibles sitios de unión de Ca²⁺ en la región C-terminal (Very y Sentenac, 2003).

Hay 5 miembros de esta familia en *Arabidopsis*: AtTPK1-5. AtTPK1 (Czempinski *et al.*, 1997) presenta una expresión ubícuca (Czempinski *et al.*, 2002, Voelker *et al.*, 2006) y se localiza en la membrana vacuolar (Schonknecht *et al.*, 2002, Bihler *et al.*, 2005). Se ha observado una alta expresión de *AtTPK1* en tejidos con altas tasas de mitosis por lo que se sugiere que AtTPK1 puede actuar en la toma de K⁺ y osmoregulación durante la elongación y el desarrollo celular (Czempinski *et al.*, 2002). *AtTPK2*, *AtTPK3* y *AtTPK5* se expresan en diferentes órganos y se ubican también en la membrana vacuolar (Schonknecht *et al.*, 2002, Deeken *et al.*, 2003, Voelker *et al.*, 2006). AtTPK4 actúa como un canal rectificador de salida expresado principalmente en polen y localizado en la membrana plasmática donde podría jugar un rol importante en la homeostasis de K⁺ y en la regulación del potencial de membrana durante el crecimiento del tubo polínico (Becker *et al.*, 2004). Existen ortólogos de TPK en otras especies como *Samanea saman SPOCK1* (Moshelion *et al.*, 2002) y patata *StKCO1α/ StKCO1β* (Czempinski *et al.*, 2002).

Canal de 1 poro (KCO-1P)

Estos canales presentan 2 TMS (Figura 1.12) y un dominio P (poro), que es el que determina la permeabilidad a K^+ (Very y Sentenac, 2002). Funcionalmente los canales KCO-1P de animales (Kir) actúan como canales rectificadores de entrada por lo que es muy posible que en plantas actúen de la misma forma (Very y Sentenac, 2003). El único representante de esta familia en *Arabidopsis* es AtKCO3 (Czempinski *et al.*, 1999) que presenta un patrón similar de expresión en tejidos vasculares de hojas, raíz, flores, tallos e hidátodos (Voelker *et al.*, 2006). Se ha ubicado AtKCO3 en la membrana vacuolar pero no se ha encontrado interacción con las proteínas AtTPK5 y AtTPK1, por lo que se piensa que las proteínas TPK y AtKCO3 forman homómeros (Voelker *et al.*, 2006).

Canales de tipo CNGC

La estructura de estos canales es muy similar a los de tipo “Shaker” pero no presentan ningún TMS sensible a voltaje ni tampoco el dominio TxxTxGYGD en el poro (Figura 1.12). Además en el segmento C-terminal presentan un posible sitio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) y a calmodulina (CaMBD) que se solapan parcialmente (Arazi *et al.*, 2000, Köhler y Neuhaus, 2000). En *Arabidopsis* existen 20 miembros de esta familia, estos canales son poco selectivos, permeables a cationes mono/divalentes (K^+ , Na^+ y Ca^{2+}) y están involucrados en la adaptación a condiciones de estrés (Very y Sentenac, 2002), pero solo 5 canales CNGC están involucrados en el transporte de K^+ : AtCNGC1 (Ali *et al.*, 2006), AtCNGC2 (Leng *et al.*, 2002, Hua *et al.*, 2003, Talke *et al.*, 2003), AtCNGC3 (Gobert *et al.*, 2006), AtCNGC4 (Balague *et al.*, 2003) y AtCNGC10 (Li *et al.*, 2005).

1.8.2 Transportadores de K^+

Estos transportadores median la entrada de K^+ a la célula de forma activa a través de la membrana plasmática y el tonoplasto. Se suelen asociar con el transporte de K^+ de alta afinidad y se ha demostrado que son regulados positivamente cuando disminuye el K^+ exógeno (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). La caracterización molecular y genética de estos sistemas basada en estudios de cinética no es una tarea fácil, por lo que gracias al empleo de mutantes de levadura deficientes en la toma de K^+ se tiene una herramienta importante para la identificación de cDNA de plantas que codifican para estos transportadores (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006).

Los transportadores de K^+ se pueden agrupar en 3 grandes familias: familia HKT, familia KUP/HAK y proteínas CPA. La familia HKT tiene homología con los canales de K^+ , presenta 4 poros y está compuesta por 2 subfamilias (Platten *et al.*, 2006) dependiendo de la presencia de serina o de glicina en el primer aminoácido del motivo $\underline{x}YG$ presente en el primer dominio P (P-loop A). La presencia de glicina determina la selectividad de K^+ en el transporte y la presencia de serina determina la selectividad de Na^+ sobre K^+ en el transporte (Maser *et al.*, 2002). Como el único representante de esta familia en *Arabidopsis AtHKT1;1* (Platten *et al.*, 2006) presenta una serina en el dominio $\underline{x}YG$, este transportador no es selectivo de K^+ por lo que no se desarrollará la implicación de esta familia en el transporte de K^+ en *Arabidopsis*.

Familia KUP/HAK

Esta familia de transportadores de K^+ fue primero identificada en *E. coli*, donde se les llamo KUP por \underline{K}^+ Uptake Permeases (Schleyer y Baker, 1993) y en el hongo *Schwanniomyces occidentales* donde se les llamo HAK por High-Affinity \underline{K}^+ (Bañuelos *et al.*, 1995). Los ortólogos en plantas, llamados KUP, HAK o KT (\underline{K}^+ Transporter), forman una amplia familia, con 13 miembros en *Arabidopsis* (Maser *et al.*, 2001, Ahn *et al.*, 2004) y numerosos miembros en otras especies (Very y Sentenac, 2003, Desbrosses *et al.*, 2004).

La estructura de estos transportadores se ha determinado mediante perfiles de hidrofobicidad y podría contener 12 TMS con una larga región citosólica entre el segundo y tercer TMS (Figura 1.13), pero no se ha identificado ninguna región involucrada en el paso de iones (Kim *et al.*, 1998, Bañuelos *et al.*, 2002 Very y Sentenac, 2003). Entre los transportadores KUP (Tabla IV) de *Arabidopsis* existen algunos de alta selectividad para K^+ y otros con baja selectividad entre K^+ y Rb^+ (Fu y Luan, 1998, Ahn *et al.*, 2004); además, se desconoce si estos transportadores son energizados por H^+ (Very y Sentenac, 2003). Otros transportadores son permeables a K^+ y Rb^+ y posiblemente permeables también a Na^+ y Cs^+ , por lo que estos iones podrían dificultar el transporte de K^+ por inhibición competitiva (Quintero y Blatt, 1997, Kim *et al.*, 1998). La expresión de los transportadores KUP de alta y baja afinidad tiene lugar en varios órganos y tejidos de la planta (Tabla IV), pero su localización subcelular es aún desconocida (Very y Sentenac, 2003).

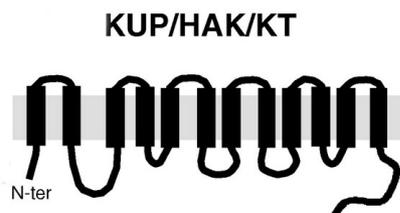


Figura 1.13 Estructura del transportador KUP/HAK/KT de Arabidopsis. Este modelo esta basado en el propuesto para bacteria y hongos (Rodríguez-Navarro, 2000). La topología de este transportador esta basada solo en los perfiles de hidrofobicidad.

Proteínas CPA

Estas proteínas comprenden antiportadores catión-protón involucrados en el transporte de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y otros cationes mono/divalentes (Maser *et al.*, 2001). Se encuentran subdivididas en 2 grandes familias de acuerdo al sistema de clasificación de transportadores TC (Saier, 2000): CPA1 y CPA2.

Tabla IV. Propiedades funcionales y localización de los transportadores KUP/HAK/KT en Arabidopsis. Flor (f), hoja (h), tallo (t), raíz (r) y silícula (s).

Nombre	Permeabilidad	Afinidad	Organo	Función	Referencia
AtKUP1	K^+ , Na^+ ?	Alta K^+ , Baja Na^+	f, h, t, r, s	Toma K^+ raíz?	Fu y Luan, 1998 Kim <i>et al.</i> , 1998
AtKUP2	K^+ , Na^+ ?	Baja K^+ , Na^+	f, h, t, r, s	Expansión celular?	Kim <i>et al.</i> , 1998 Elumalai <i>et al.</i> , 2002
AtKUP3	—	—	f, h, t, r, s	—	Kim <i>et al.</i> , 1998
AtKUP4	K^+	Alta	f, h, t, r, s	Elongación pelos radicales	Kim <i>et al.</i> , 1998 Rigas <i>et al.</i> , 2001
AtKUP5	K^+	—	h, t, r, s	—	Ahn <i>et al.</i> , 2004
AtKUP6	K^+	—	f, h, t, r, s	—	Ahn <i>et al.</i> , 2004
AtKUP7	K^+	—	f, h, t, r, s	—	Ahn <i>et al.</i> , 2004
AtKUP8	—	—	f, h, t, r, s	—	Ahn <i>et al.</i> , 2004
AtKUP9	—	—	f, h, t, s	—	Ahn <i>et al.</i> , 2004
AtKUP10	K^+	—	h, r	—	Ahn <i>et al.</i> , 2004
AtKUP11	K^+	—	—	—	Ahn <i>et al.</i> , 2004
AtKUP12	—	—	h r	—	Ahn <i>et al.</i> , 2004
AtHAK5	K^+ , Rb^+	Alta K^+ , Rb^+	r	Toma K^+ raíz	Ahn <i>et al.</i> , 2004 Gierth <i>et al.</i> , 2005

La familia CPA1 en *Arabidopsis* está formada por 8 miembros (AtNHX1-8) de los que solo AtNHX1 está involucrada en el transporte de K^+ (Zhang y Blumwald, 2001, Venema *et al.*, 2002). La expresión de *AtNHX1* es ubicua a toda la planta y se localiza en la vacuola,

donde actúa como regulador del pH citoplasmático y mecanismo de entrada de Na^+ y K^+ (Apse *et al.*, 2003, Qiu *et al.*, 2004). La familia CPA2 en *Arabidopsis* está formada por 34 miembros, entre ellos 6 transportadores KEA que fueron identificados por homología a los antiportadores K^+/H^+ bacterianos Kef (Maser *et al.*, 2001). Aunque no se conoce su localización subcelular se ha propuesto que podrían intervenir en la entrada de K^+ en la vacuola (Maser *et al.*, 2001). Los otros miembros de la familia CPA2 son los transportadores CHX1-28 que son ortólogos a antiportadores Na^+/H^+ de mamíferos y bacterias (Maser *et al.*, 2001). AtCHX17 está involucrado en la adquisición y homeostasis de K^+ (Cellier *et al.*, 2004). La función de AtCHX17 podría ser la toma de K^+ en las raíces, ya que AtCHX17 se expresa en el córtex y la epidermis de raíces maduras, además el mutante *chx17* acumula menos K^+ en la raíz (Cellier *et al.*, 2004). Otro antiportador de esta familia, AtCHX23, se expresa en el cloroplasto donde funciona como antiportador $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ y podría regular el pH así como el funcionamiento y desarrollo del cloroplasto (Song *et al.*, 2004).

1.9 Regulación de la toma y transporte de K^+ en la planta

En las plantas, la regulación del transporte de K^+ se da a varios niveles: en la toma de K^+ del suelo, en la traslocación de K^+ desde la raíz a la parte aérea y en la entrada y salida de K^+ de las células en los diferentes tejidos de la planta. A nivel molecular, la regulación del transporte de K^+ puede tener lugar de dos formas: una regulación a nivel transcripcional que se manifiesta en el aumento o disminución de la expresión de canales y/o transportadores de K^+ producida por: ayuno de K^+ (Ashley *et al.*, 2006), estrés salino (Zhu, 2003) y por hormonas (Pilot *et al.*, 2003), y una regulación a nivel post-transcripcional que se muestra en el aumento o disminución de la actividad de los canales y/o transportadores de K^+ debida a la acción de proteínas reguladoras (Very y Sentenac, 2003, Cherel, 2004), cationes (Maathuis, 2006), voltaje (Very y Sentenac, 2003) y estímulos ambientales (Shabala, 2003).

Existe también una interconexión entre los diversos factores que regulan el transporte de K^+ , lo que dificulta la comprensión total de esta regulación. Por ejemplo tenemos que el estrés salino, sequía y frío producen un aumento de ABA (Xiong *et al.*, 2002) que influye en la expresión de canales de K^+ (Pilot *et al.*, 2003); otro caso es el Ca^{2+} , que actúa como segundo mensajero en respuesta al estrés salino siendo un cofactor de proteínas reguladoras de canales de K^+ , pero también el ion Ca^{2+} , por si mismo puede regular la actividad de los canales de K^+ (Shabala *et al.*, 2006, Gambale y Uozumi, 2006).

Por último es necesario mencionar la presencia de diferentes dominios en el extremo C-terminal de los canales de K^+ , que pueden ser del tipo EF de unión de Ca^{2+} , dominios ankirina, dominios de unión de nucleótidos cíclicos (CNBD) y dominios de unión de calmodulina (CaMBD). Estos dominios pueden ser posibles dianas de proteínas reguladoras, AMP cíclico y Ca^{2+} , moléculas que han sido descritas por su función reguladora.

1.9.1 Factores que regulan el transporte de K^+ en la planta

Papel del K^+

Se ha demostrado que el ayuno de potasio activa el transporte de K^+ en plantas (Fernando *et al.*, 1990, Shin y Schachtman, 2004), además, esta activación se ha asociado al aumento de expresión de transportadores de alta afinidad y se ha considerado esta respuesta como el principal mecanismo de adaptación a condiciones de bajo potasio (Ashley *et al.*, 2006). Así tenemos que el transportador HAK5 de *Arabidopsis* muestra un aumento en sus niveles de expresión en condiciones de ayuno de potasio (Ahn *et al.*, 2004, Armengaud *et al.*, 2004, Gierth *et al.*, 2005), dicho aumento parece ser una respuesta común en todas las plantas sometidas a ayuno de potasio, ya que se ha demostrado que los ortólogos de *AtHAK5* en cebada *HvHAK1* (Santa-Maria *et al.*, 1997), tomate *LeHAK5* (Wang *et al.*, 2002) y arroz *OsHAK1* (Bañuelos *et al.*, 2002) son inducidos por niveles bajos de K^+ externo. Otros transportadores inducidos por ayuno de potasio son *AtKUP3* (Kim *et al.*, 1998), *KEA5* (Shin y Schachtman, 2004) y *AtCHX17* (Cellier *et al.*, 2004). Sin embargo, es importante mencionar que *AtKUP2* y *AtKUP12* se reprimen en condiciones de bajo potasio (Kim *et al.*, 1998, Armengaud *et al.*, 2004).

En el caso de los canales de *Arabidopsis*, el ayuno de potasio produce la disminución en la expresión de *SKOR* y *AKT2* (Maathuis *et al.*, 2003, Pilot *et al.*, 2003). Al estar estos canales involucrados en el transporte a larga distancia de K^+ , se ha sugerido que su represión en condiciones de bajo potasio es requerida para evitar la recirculación de K^+ entre raíz y parte aérea (Ashley *et al.*, 2006). En el caso de *AKT1*, no se ha visto una variación de la expresión en condiciones de bajo potasio (Maathuis *et al.*, 2003, Pilot *et al.*, 2003), pero se ha observado un aumento en la actividad de los canales de entrada de K^+ (Maathuis y Sanders, 1995, Hirsch *et al.*, 1998) por lo que se ha planteado que la activación de *AKT1* podría ser post-transcripcional (Ashley *et al.*, 2006). Un dato importante es que *AKT1* puede formar complejos heteroméricos con *AtKC1* (Reintanz *et al.*, 2002, Pilot *et al.*, 2003) y como se ha

demostrado que *AtKCI* es inducido en condiciones de bajo potasio (Shin y Schachtman, 2004) es posible que AKT1 se active a través de la interacción con AtKC1 (Ashley *et al.*, 2006).

Se desconoce la ruta de señalización implicada en la inducción o represión de canales y/o transportadores producida por el ayuno de potasio, pero se ha planteado que el peróxido de hidrógeno estaría involucrado en esta ruta de señalización (Shin y Schachtman, 2004). En condiciones de bajo potasio, los experimentos de micromatrices muestran pocos transportadores inducidos, por lo que se plantea que también existe un mecanismo post-transcripcional de adaptación a bajo potasio (Gierth *et al.*, 2005).

Un interesante mecanismo regulatorio post-transcripcional se da en el canal KAT1 de células oclusivas, que se inactiva a concentraciones externas muy bajas (micromolares) de K^+ debido a la desestabilización del estado de conductancia y al colapso del poro (Hertel *et al.*, 2005). En condiciones normales las células oclusivas toman K^+ para abrir el estoma, pero en casos donde la concentración externa de K^+ en el apoplasto es muy baja, la fuerza ion motriz del K^+ sería a favor de la salida de K^+ de la célula y si los canales rectificadores de entrada (KAT1) estuvieran activos en estas condiciones, el K^+ interior se perdería a través de estos canales (Hertel *et al.*, 2005). Igualmente, los canales SKOR y GORK perciben la concentración externa de K^+ por un mecanismo desconocido que les permite modular la apertura y cierre del poro (Ache *et al.*, 2000, Johansson *et al.*, 2006).

La concentración interna de K^+ en la célula también regula la actividad del canal SKOR (Liu *et al.*, 2006). La explicación propuesta es que SKOR funciona como un sensor de la concentración de K^+ en la raíz, así tenemos que una mayor concentración de K^+ en las células de la raíz provoca una mayor actividad de SKOR y por lo tanto mas potasio es descargado al xilema y transportado a la parte aérea; por el contrario, si la raíz no acumula suficiente K^+ , la actividad de SKOR disminuye y menos potasio será traslocado a la parte aérea (Liu *et al.*, 2006).

Papel del Ca^{2+}

Se ha determinado que el Ca^{2+} participa en la regulación de canales de K^+ . En *Arabidopsis*, el Ca^{2+} apoplástico previene la salida de K^+ de la célula en las hojas y raíz regulando (directa o indirectamente) los canales de salida de K^+ (Shabala *et al.*, 2006). El Ca^{2+} también inhibe la actividad de canales de entrada de K^+ en maíz (Su *et al.*, 2005), arroz

(Fuchs *et al.*, 2005), álamo (Langer *et al.*, 2002) y en *Arabidopsis*, donde el canal KAT1 es inhibido ligeramente por Ca^{2+} (Dreyer *et al.*, 1998).

El canal AKT2/3 podría jugar un papel importante regulando la sensibilidad a Ca^{2+} de otros canales, por ejemplo, los canales rectificadores de entrada de K^+ en las células oclusivas son bloqueados por Ca^{2+} solo en presencia de AKT2/3, por lo tanto se ha planteado la idea de que AKT2/3 puede actuar como sensor de Ca^{2+} para los canales de entrada de K^+ en las células oclusivas (Ivashikina *et al.*, 2005).

El Ca^{2+} funciona también como molécula señalizadora. Previamente se había descrito su función en la vía SOS, que está formada por SOS3 (CBL4), SOS2 (CIPK24) y SOS1 (antiportador Na^+/H^+), y recientemente se ha descubierto una ruta de regulación del canal AKT1 en *Arabidopsis* donde la proteína quinasa CIPK23 directamente fosforila el canal AKT1 en condiciones de bajo potasio, además, CIPK23 es activado por la unión de dos proteínas similares a la calcineurina B, CBL1 y CBL9 dependientes de Ca^{2+} (Li *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2006).

Potencial de membrana y pH

Los canales tipo “Shaker” de *Arabidopsis* presentan un sensor de voltaje y se ha demostrado en AKT2 y KAT1 la regulación de su actividad por el potencial de membrana (Dreyer *et al.*, 2001, Latorre *et al.*, 2003); otro canal regulado por voltaje es TPK1, aunque se desconoce su sensor de voltaje (Czempinski *et al.*, 1997). El sensor de voltaje en los canales tipo “Shaker” se encuentra en el cuarto TMS (S4) y está cargado positivamente, el movimiento de este sensor en respuesta a los cambios de voltaje es en la misma dirección en rectificadores de entrada y salida, por ejemplo hacia el citoplasma cuando la membrana se hiperpolariza; sin embargo, un movimiento de S4 en una dirección produce efectos opuestos en la apertura del canal en rectificadores de entrada y de salida (Zei y Aldrich, 1998). En el caso de AKT2, la fosforilación de la región S4 regula su actividad: cuando AKT2 no está fosforilado se comporta como un canal rectificador de entrada, pero cuando está fosforilado su actividad es prácticamente nula en el rango fisiológico de voltaje, ya que se produce un cambio en el voltaje umbral de activación volviéndose más positivo (>200 mV) (Michard *et al.*, 2005a, Michard *et al.*, 2005b). En el caso de los transportadores de K^+ en *Arabidopsis* parece que su actividad no es sensible al potencial de membrana (Very y Sentenac, 2003).

Con respecto al pH, varios canales de K^+ de plantas son regulados por el pH interno y externo (Gambale y Uozumi, 2006). En el caso de los canales rectificadores de entrada, se observan dos mecanismos para su activación por acidificación externa: un incremento macroscópico de la conductancia de K^+ sin cambios en las propiedades de apertura del canal, como se observa en el canal KAT1 (Very *et al.*, 1995, Pilot *et al.*, 2001); o un cambio en el umbral de activación del canal sin cambio en la conductancia, como se observa en KAT2 y SPIK (Hoth *et al.*, 1997, Mouline *et al.*, 2002). KAT1 también se activa por acidificación del citoplasma habiéndose identificado que el sensor interno de pH comprende un residuo de histidina en la región entre TMS2 y TMS3 (Hoshi, 1995, Tang *et al.*, 2000, Hoth *et al.*, 2001). El canal rectificador de salida débil AKT2 es inhibido por acidificación interna y externa (Lacombe *et al.*, 2000b), aunque en este caso, la inhibición de AKT2 parece estar asociada con el bloqueo del canal por protones, como se ha demostrado por la disminución de la conductancia (Marten *et al.*, 1999).

En el caso de los canales rectificadores de salida, SKOR es inhibido por acidificación interna y externa (Lacombe *et al.*, 2000a), mientras que GORK solo es inhibido por acidificación externa (Ache *et al.*, 2000). En SKOR se ha observado una disminución en el flujo de K^+ sin cambios en las propiedades de apertura del canal o en la conductancia sugiriendo que el pH modula el número de canales SKOR disponibles para el transporte de K^+ (Lacombe *et al.*, 2000a).

Hormonas y ROS

Existen varios trabajos que demuestran que el transporte de K^+ en plantas está bajo control hormonal (Roberts y Snowman, 2000, Pilot *et al.*, 2003, Ashley *et al.*, 2006, Fuchs *et al.*, 2006). En células oclusivas, el ABA inhibe los canales de entrada y activa los canales de salida de K^+ de manera dependiente e independiente de Ca^{2+} (Roberts y Snowman, 2000). El ABA puede elevar el nivel de Ca^{2+} citosólico en las células oclusivas, lo que inhibiría los canales de entrada, pero los canales de salida son insensibles a ABA por lo que se han propuesto varios segundos mensajeros que podrían formar parte de la señal de ABA independiente de Ca^{2+} , como el pH y las proteínas G (Roberts y Snowman, 2000). El ABA también regula el transportador AtNHX1 (Yokoi *et al.*, 2002).

El ABA también controla la carga de K^+ en el xilema mediante la regulación del canal SKOR (Pilot *et al.*, 2003), para ello se han planteado 2 mecanismo: un mecanismo a largo plazo mediante la regulación de la transcripción, que se ha conocido al observar que la

expresión de SKOR disminuye dramáticamente después de 3 horas de exposición a ABA (Roberts y Snowman, 2000, Pilot *et al.*, 2003) y otro mecanismo a corto plazo mediante la regulación post-transcripcional, dilucidado al observar que la aplicación directa de ABA en protoplastos de la estela de raíz, en experimentos de “patch clamp”, reduce el flujo de salida de K^+ (Roberts, 1998) pero no se conoce el mecanismo responsable de esta regulación (Roberts y Snowman, 2000). El ABA es una hormona que participa en la respuesta a sequía y estrés por NaCl (Zhu, 2002), así que esta hormona puede estar involucrada en una respuesta general de la planta al déficit de agua permitiendo ajustes osmóticos, ya que aparte de la disminución de los niveles y actividad de SKOR, el ABA también produce el aumento de expresión de AKT2 en la parte aérea (Pilot *et al.*, 2003). Esto podría resultar en un aumento de la acumulación de K^+ en la región apical de la raíz, favoreciendo su crecimiento en suelos con déficit de agua (Sharp *et al.*, 1990, Pilot *et al.*, 2003).

De manera similar, los efectos de auxinas y giberelinas producen una disminución de la expresión de SKOR que llevaría a una menor traslocación de K^+ hacia la parte aérea, favoreciendo el crecimiento de la raíz (Pilot *et al.*, 2003). Además las auxinas promueven la elongación celular en la raíz mediante la activación de canales de entrada de K^+ (Fuchs *et al.*, 2006).

Mediante un análisis de micromatrices se observó que varias enzimas involucradas en la biosíntesis y señalización de ácido jasmónico son inducidas en condiciones de ayuno de K^+ , igualmente se observó la activación del gen *AtADC2* involucrado en la biosíntesis de putrescina (Armengaud *et al.*, 2004), este resultado está en concordancia con el incremento en el contenido de putrescina observado en plantas sometidas a ayuno de K^+ (Watson y Malmberg, 1996). Las poliaminas bloquean canales de cationes vacuolares (Dobrovinskaya *et al.*, 1999) y el canal de K^+ *AtKAT1* (Liu *et al.*, 2000), pero aun no se sabe si los efectos de las poliaminas son importantes para la aclimatación de la planta a condiciones de estrés (Ashley *et al.*, 2006).

Recientemente se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son muy importantes para la regulación de la respuesta de *Arabidopsis* a ayuno de K^+ , en estas condiciones se observa una activación del sistema de transporte de K^+ de alta afinidad acompañada de un incremento de la producción de H_2O_2 (Shin y Schachtman, 2004). La señalización por ROS también activa el sistema de transporte de K^+ de alta afinidad en condiciones de suficiencia de K^+ (Shin y Schachtman, 2004). Además, la expresión del gen

RHD2 (NADPH oxidasa) parece ser necesaria para la producción de H_2O_2 en respuesta al ayuno de K^+ , ya que el mutante *rhd2* no mostró la inducción de los transportadores HAK5 y KEA5 en condiciones de ayuno de K^+ (Shin y Schachtman, 2004).

La inducción de genes relacionados con el ácido jasmónico y la producción de ROS indican un solapamiento entre las cascadas de señalización en condiciones de bajo K^+ y daño por herida (Ashley *et al.*, 2006). Esta idea se ve reforzada por la activación de genes de biosíntesis y señalización de etileno en condiciones de ayuno de K^+ (Shin y Schachtman, 2004) ya que el etileno, junto con el ácido jasmónico, juegan un papel importante en la respuesta de *Arabidopsis* a herida (Devoto y Turner, 2003). El papel del etileno en condiciones de ayuno de K^+ fue confirmado midiendo la cantidad de etileno producida en plantas sometidas a ayuno de K^+ , donde se observó un aumento en la producción de esta fitohormona comparando con plantas en condiciones normales (Shin y Schachtman, 2004).

Proteínas y moléculas reguladoras

Los análisis de electrofisiología en células de plantas y en sistemas heterólogos, así como el empleo de genética reversa han permitido revelar la importancia de las proteínas quinasas y fosfatasas en la regulación de los canales tipo “Shaker” en plantas (Blatt, 2000, Schroeder *et al.*, 2001). Empleando inhibidores de la actividad de las fosfatasas 1 y 2A en células oclusivas se ha observado una inhibición del flujo de entrada de K^+ , sin modificación del flujo de salida (Li *et al.*, 1994b) o con inhibición del flujo de salida (Thiel y Blatt, 1994). Sin embargo, en células del mesófilo, los inhibidores de la fosfatasa 1 y 2A activaron el flujo de salida de K^+ (Li *et al.*, 1994b), por lo que es posible que la regulación de la actividad de los canales de K^+ mediada por las fosfatasas 1 y 2A sea diferente dependiendo del tipo de célula (Cherel, 2004). Por otro lado, los inhibidores de la proteína fosfatasa 2B bloquean la inactivación del flujo de entrada de K^+ de células oclusivas en respuesta al aumento del Ca^{2+} citoplasmático (Luan *et al.*, 1993). En el caso de las fosfatasas 2C, no se conocen inhibidores de su función pero empleando plantas transgénicas de tabaco sobreexpresando el gen mutante dominante *abi-1* (proteína fosfatasa 2C) de *Arabidopsis* se observó que el flujo de K^+ en las células oclusivas era insensible a ABA (Armstrong *et al.*, 1995).

Mediante un análisis de doble híbrido en levadura se identificó que la fosfatasa AtPP2CA (fosfatasa similar a ABI1) interacciona con el canal AKT2 (Vranova *et al.*, 2001, Cherel *et al.*, 2002). La interacción se produce entre la región C-terminal del canal y el

dominio catalítico de la fosfatasa (Cherel *et al.*, 2002), además, la coexpresión de *AtPP2CA* y *AKT2* en sistemas heterólogos produce una disminución en la conductancia y un aumento en los niveles de rectificación de *AKT2* (Cherel *et al.*, 2002). Se conoce que *AtPP2CA*, al igual que *ABI1*, están envueltos en la señalización por ABA (Sheen, 1998), por lo que se plantea la posibilidad de que la interacción *AtPP2CA/AKT2*, bajo el control de ABA, provoque la regulación de la conductancia de K^+ y el potencial de membrana, mediante el cambio de *AKT2* desde un canal poco activo de K^+ a un canal rectificador de entrada (Cherel *et al.*, 2002, Very y Sentenac, 2003).

Mediante el empleo de reguladores de la actividad de la proteína quinasa A (PKA), que no se encuentra en plantas, se ha demostrado que las proteínas quinasas están envueltas en la regulación de canales de K^+ (Cherel, 2004). El empleo de AMP cíclico (activador de PKA), que tampoco se encuentra en plantas, produce un aumento en la conductancia de salida de K^+ , mientras que inhibidores de PKA reducen esta conductancia en protoplastos de mesófilo (Li *et al.*, 1994a). Análisis bioquímicos han revelado que el estado de fosforilación del canal *KAT1* es regulado por proteínas quinasas (Li *et al.*, 1998), además, la coexpresión de una quinasa dependiente de Ca^{2+} y *KAT1* en oocitos de *Xenopus* cambia el umbral de activación del canal volviéndolo más negativo y disminuye el nivel de conductancia (Berkowitz *et al.*, 2000). Recientemente se ha demostrado que las fosfatidilinositol fosfato (PIPs) y las fosfatidilinositol quinasas (PI quinasas) son importantes para mantener la actividad del canal *SKOR* mediante la unión de PIPs a la región del poro (Liu *et al.*, 2005).

Al estar involucradas fosfatasas y quinasas en la regulación de canales de K^+ , el ATP debe ser un componente importante en esta regulación. Este hecho se ha demostrado con experimentos en los que el ATP, y análogos no hidrolizables de ATP, afectan a la actividad de los canales de K^+ (Cherel, 2004). En “patches” de células de mesófilo de *Arabidopsis*, el ATP activó la conductancia de rectificadores de salida débiles de K^+ (Spalding y Goldsmith, 1993) pudiendo deberse a la activación de *AKT2* (Dennison *et al.*, 2001, Very y Sentenac, 2002). En protoplastos y “patches” de canales únicos aislados de *Samanea saman*, la desaparición de la actividad funcional (“rundown”) de los canales de salida de K^+ puede ser revertida por la aplicación de MgATP en el lado citoplasmático (Moran, 1996). También se ha demostrado que el proceso “rundown” observado en *KAT1* después de la excisión de “patches” de membrana fue revertido por la aplicación de ATP pero no por un análogo no hidrolizable de

ATP (Hoshi, 1995). El proceso “rundown” también fue revertido en el canal AKT1 expresado en células de insectos cuando se agregó ATP (Gaymard *et al.*, 1996, Urbach *et al.*, 2000).

Los niveles de ATP y la actividad de las PI quinasas son determinantes críticos de la actividad de canales de K^+ , como se ha demostrado para el caso de los canales AtSKOR, AtKAT1 y LeLKT1 (Liu *et al.*, 2005). El mecanismo propuesto para la regulación de los canales de K^+ por ATP se basa en 2 puntos:

- Producción de PIPs mediante PI quinasas y ATP.
- Aumento del potencial de membrana a través de la actividad de la H^+ -ATPasa que consume ATP.

Así tenemos que el prerrequisito para la activación dependiente de voltaje es el cambio en el estado de apertura/cierre de los canales de K^+ producido por los PIPs. Este mecanismo indirecto puede considerarse una regulación primaria, mientras que la regulación por voltaje de los canales de K^+ a través de cambios en el potencial de membrana actúa como una regulación secundaria (Liu *et al.*, 2005). Ambos mecanismos son controlados por los niveles de ATP, lo cual refleja la importancia del metabolismo energético en la actividad de los canales de K^+ .

El papel de las proteínas G en la regulación de canales de K^+ fue demostrado por primera vez en células oclusivas de *V. faba*, donde empleando análogos de GDP y GTP, que activan o inactivan las proteínas G, se observa una disminución o aumento en la conductividad de entrada-salida de K^+ , respectivamente (Fairley-Grenot y Assmann, 1991, Li y Assman, 1993). Contrariamente, en las células del parénquima del xilema, la conductancia de la entrada de K^+ se incrementa por activadores de proteínas G (Wegner y de Boer, 1997). En *Arabidopsis*, el mutante *gal* (subunidad $G\alpha$) no muestra una reducción de la conductividad de entrada de K^+ inducida por ABA (Wang *et al.*, 2001). Finalmente, se ha propuesto que el Ca^{2+} puede modular los efectos de las proteínas G sobre los canales de K^+ en plantas (Kelly *et al.*, 1995).

En células animales se han identificado oxidoreductasas que se unen a los canales tipo “Shaker” y regulan su actividad. A estas proteínas reguladoras se les conoce como subunidades beta (Gulbis *et al.*, 1999). En *Arabidopsis* se ha encontrado el gen *KAB1* que codifica un homólogo de la subunidad beta de animales $Kv\beta$ (Tang *et al.*, 1995). La proteína KAB1 se une a KAT1 y AKT1 *in vitro* (Tang *et al.*, 1996, Tang *et al.*, 1998) y cuando se

coexpresan KAB1 y KAT1 en oocitos de *Xenopus* aumenta la conductividad de KAT1, posiblemente al estabilizarse el complejo que forma el canal en la membrana de manera similar a Kv β en animales (Zhang *et al.*, 1999).

Estrés salino

La adaptación de las plantas al estrés por NaCl comprende importantes cambios en los niveles de expresión de canales y transportadores de K⁺ (Pilot *et al.*, 2003, Maathuis, 2006). El canal *AtKCl1* presenta un aumento de expresión en las hojas después de un tratamiento con NaCl, que podría provocar cambios en el proceso de gutación y/o en la compartimentación de Na⁺ y K⁺ en los diferentes tejidos de la hoja (Pilot *et al.*, 2003). Es posible que en *Arabidopsis* los tricomas tengan un papel en la respuesta al estrés por NaCl acumulando y excretando Na⁺ de la planta y que *AtKCl1* está involucrado en este mecanismo (Pilot *et al.*, 2003). La expresión de *AKT2/3* y *SKOR* también es inducida por NaCl (Maathuis, 2006). En el caso de *SKOR*, este aumento de expresión es independiente del ABA, ya que el ABA produce una disminución de la expresión de *SKOR* (Gaymard *et al.*, 1998). El aumento de la expresión de *AKT2/3* en la parte aérea y *SKOR* en raíz durante un estrés por NaCl podría producir un incremento de la tasa de circulación de K⁺ a través de los tejidos vasculares y generar una redistribución de K⁺ entre la parte aérea y la raíz (Maathuis, 2006).

Con respecto a los transportadores de *Arabidopsis*, *KUP2* presenta una disminución de su expresión en la parte aérea de plantas tratadas con NaCl y esta represión puede provocar la pérdida de turgencia y una reducción general del crecimiento producida por la salinidad en tejidos en desarrollo (Elumalai *et al.*, 2002, Maathuis, 2006). Los transportadores *KUP6* y *KUP11* son inducidos durante estrés por NaCl y podrían regular el mantenimiento de los niveles de K⁺ citoplasmático y/o turgencia cuando el Na⁺ externo dificulta la toma de K⁺ (Maathuis, 2006). *TPK5* es reprimido por NaCl y esta represión puede estar unida a un mantenimiento de los niveles de K⁺ citoplasmático y/o intercambio de K⁺ vacuolar por Na⁺ (Maathuis, 2006). Finalmente, en condiciones de estrés por NaCl, el gen que codifica el antiportador CHX17 se induce y los genes de los canales CNGC1 y CNGC3 presentan un aumento y una disminución de la expresión, respectivamente (Maathuis, 2006).

La ruta de regulación del transporte de K⁺ por NaCl no es muy clara, ya que un estrés por NaCl produce otros efectos como estrés osmótico, y por lo tanto un aumento de la biosíntesis de ABA (Wilkinson y Davies, 2002). Además el estrés por NaCl produce un incremento del Ca²⁺ citosólico (Sanders *et al.*, 1999; Knight, 2000) por lo que es posible que

la regulación por NaCl no sea de forma directa sino a través de otras moléculas y/o segundos mensajeros.

1.10 Toma de iones en la raíz: Transporte a corta distancia

La toma de iones en las raíces requiere del paso de iones a través de las células de la epidermis, del córtex, de la endodermis, de las células parenquimáticas del xilema (periciclo) para finalmente llegar al xilema, donde son transportados a la parte superior de la raíz y a la parte aérea impulsados por la corriente ascendente de agua generada por el flujo de transpiración (Fernández y Maldonado, 2000). Los iones siguen un camino similar al transporte radial del agua en la raíz para alcanzar el xilema. Pero, a diferencia del agua, sólo se han descrito 2 rutas principales a través del córtex, con diferentes implicaciones para los distintos tipos de solutos.

La **vía apoplástica**, donde agua, iones y moléculas de pequeño tamaño pueden difundir libremente a través del espacio libre aparente o apoplasto, que viene a ser el espacio intercelular. La **vía simplástica**, donde los iones son incorporados a las células de la epidermis o del córtex y luego son transportados, célula a célula a través de plasmodesmos, hasta el xilema (Figura 1.14). Dentro de los plasmodesmos hay otro tubo llamado desmotúbulo, que es la continuación del retículo endoplasmático de las células adyacentes. Debido a que los plasmodesmos están parcialmente ocluidos por los desmotúbulos, el movimiento de moléculas grandes tales como proteínas, requiere mecanismos especiales, pero el agua y los iones pueden atravesar los plasmodesmos por simple difusión (Taiz y Zeiger, 2002).

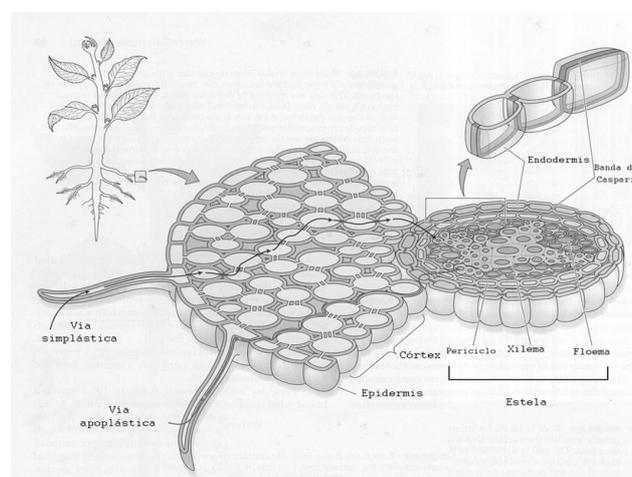


Figura 1.14 Esquema de las vías simplástica y apoplástica para la incorporación de nutrientes a través de la raíz. (Taiz y Zeiger, 2002).

1.10.1 Transporte radial de iones a través de la raíz

Primero, los iones deben atravesar la superficie externa de las raíces (epidermis), cuya pared celular es permeable a iones y solutos pequeños. Esta toma inicial de iones por la raíz es mayor en los pelos radiculares que en la raíz principal, ya que las células de los pelos radiculares han completado su elongación pero no presentan aún crecimiento secundario por lo que los pelos radiculares son solo extensiones de células epidérmicas que incrementan la superficie para la absorción de iones (Taiz y Zeiger, 2002). Los iones que entran en la raíz pueden inmediatamente entrar en el simplasto atravesando la membrana plasmática de una célula epidérmica o avanzar por el apoplasto a través de las paredes celulares de las células epidérmicas hasta llegar al córtex. En el apoplasto del córtex, conformado por los espacios intercelulares y el periplasma (los iones se ubican tanto en el periplasma como en el espacio intercelular ya que la pared celular es permeable a iones), los iones pueden entrar al simplasto atravesando la membrana celular de una célula cortical, o permanecer en el apoplasto del córtex. En este último caso, para que los iones puedan llegar a la estela será necesario que entren en algún momento al simplasto, debido a la presencia de una capa de células llamada endodermis que presenta suberina impregnada en las paredes (banda de Caspari), la cual impide el paso de agua e iones.

Aunque la banda de Caspari es una barrera impermeable e infranqueable para agua e iones, no es una barrera perfecta. Pueden existir células ubicadas en la endodermis que permiten el paso de iones y agua por la vía apoplástica (Marschner, 1995), además, en la zona apical de la raíz, la banda de Caspari no está completamente desarrollada, lo que permite el transporte apoplástico hacia la estela. Sin embargo, cationes polivalentes como el Al^{3+} tienen restringida la entrada a la estela por la vía apoplástica en la zona apical, debido al mucílago formado en la superficie externa de las células endodérmicas (Marschner, 1995). También, en los sitios donde emergen las raíces laterales desde el periciclo, existe una ruptura momentánea de la banda de Caspari debido a la penetración de las raíces laterales en el córtex. En estos sitios, la vía apoplástica hacia la estela es importante para la toma de Ca^{2+} (White y Broadley, 2003), la toma de agua en situaciones de alta transpiración (Sanderson, 1983) y para la toma y transporte a la parte aérea de sodio bajo condiciones de salinidad (Yeo *et al.*, 1987).

La permeabilidad, afinidad y selectividad de los canales y transportadores localizados en la membrana citoplasmática de las células de la epidermis y del córtex determina qué solutos y a qué velocidad se incorporan a la vía simplástica. El transporte de iones en el

simplasto es probablemente por difusión, facilitado por el flujo radial de agua. Durante este transporte radial de iones se produce una competencia entre la acumulación en vacuolas y el transporte simplástico, que depende de la disponibilidad de nutrientes y su concentración en las vacuolas de las células de la raíz por donde se genera el flujo simplástico. Como resultado de esta competición, cuando un nutriente mineral está en concentraciones subóptimas, las raíces usualmente acumulan mayor cantidad del nutriente particular que la parte aérea (“traslocación restringida”). En la vía simplástica de plantas que excluye los cationes tóxicos de la parte aérea, una acumulación de ciertos iones, como Na^+ , puede tener lugar en las vacuolas de las células de la raíz para evitar su traslocación (Marschner, 1995). Un mecanismo similar existe en ciertos genotipos de maíz, donde se restringe la traslocación de Cd^{2+} a la parte aérea (Florijn y van Beusichem, 1993).

Una vez que los iones han entrado en la estela a través de la vía simplástica, continúa la difusión de los iones por los plasmodesmos hasta alcanzar el xilema. Los iones entran al apoplasto de la estela por difusión desde las células que rodean el xilema (**parénquima del xilema**), donde nuevamente la banda de Caspari evita la difusión de iones hacia el córtex, así tenemos que la banda de Caspari permite a la planta mantener una mayor concentración de iones en el xilema que en la parte exterior de las raíces (Taiz y Zeiger, 2002).

1.10.2 Liberación de iones en el xilema

Los iones deben ser cargados en el xilema para ser traslocados a la parte aérea. Debido a que el xilema está formado por células muertas, ellos carecen de continuidad citoplasmática con las células que lo rodean, así que para entrar en el xilema los iones deben salir de la vía simplástica. El mecanismo de secreción de iones desde el parénquima del xilema hacia el xilema (**carga del xilema**) no está muy claro. La concentración de iones en el xilema no está correlacionada con la cantidad del flujo de agua, sugiriendo que el proceso de carga del xilema no está influenciado por la tasa de transpiración a tiempos cortos (Marschner, 1995). Se ha observado que la carga del xilema puede involucrar transporte activo de iones en la estela (Lacan y Durand, 1996) ya que inhibidores de la respiración parecen inhibir la carga del xilema (Fernández y Maldonado, 2000). Además existe evidencia de un transporte activo que carga protones en el xilema (Clarkson y Hanson, 1986).

Sin embargo, existe más evidencia de una difusión pasiva de iones en la carga del xilema, como parece ser el caso de K^+ , Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} y NO_3^- (Köhler y Raschke, 2000; Taiz

y Zeiger, 2002) que son impulsados por un gradiente de potencial electroquímico favorable. En el parénquima del xilema de cebada, se han identificado dos tipos de canales de salida de iones: canales específicos de salida de K^+ y canales inespecíficos de salida de iones, estos canales se encuentran regulados por el potencial de membrana y por la concentración citosólica de Ca^{2+} (Wegner *et al.*, 1994, Wegner y de Boer, 1999). Se han descrito canales de aniones que median la carga de Cl^- al xilema en células parenquimáticas de xilema de cebada (Wegner y Raschke, 1994, Köhler y Raschke, 2000), en células de la estela de maíz (Gilliham y Tester, 2005) y en células del periciclo de *Arabidopsis* (Kiegle *et al.*, 2000). Usando “patch clamping” en la células de la estela de *Arabidopsis* se demostró la presencia de canales de cationes que pueden participar en la carga del xilema (Wegner y de Boer, 1997, Maathuis y Sanders, 1999). También en *Arabidopsis* se descubrió el canal rectificador de salida de K^+ (SKOR) ubicado en las células del parénquima del xilema e implicado en la carga de K^+ en el xilema (Gaymard *et al.*, 1998).

Estos datos sugieren que el flujo de iones de las células del parénquima del xilema hacia el xilema, es debido a una simple difusión de iones, bajo un fino control metabólico, a través de la regulación de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática y los canales de salida de iones.

1.11 Plegamiento de proteínas y familia de las sulfidril oxidasas

El principal paso en el plegamiento oxidativo de proteínas es la formación de enlaces disulfuro, que es llevada a cabo por proteínas disulfuro isomerasa (PDI) en eucariotas y por la maquinaria de enlaces disulfuro (Dsb) en procariotas (LaMantia y Lennarz *et al.*, 1993, Bardwell, 1994).

En bacterias, la familia Dsb de oxidoreductasas regula la formación de enlaces disulfuro en el periplasma bacteriano mediante 2 rutas de transferencia de electrones distintas: la ruta de oxidación y la ruta de isomerización (Kadokura, 2003, Messens y Collet, 2006). En la ruta de oxidación, la proteína DsbA forma enlaces disulfuro en proteínas de secreción reduciendo un enlace disulfuro de su sitio activo; posteriormente la forma activa de DsbA es restaurada por la proteína de membrana DsbB que usa el poder oxidante del sistema de transporte de electrones. El paso catalizado por el complejo DsbA-DsbB es rápido y no específico, y en el caso de proteínas con múltiples grupos sulfidrilos se pueden generar enlaces disulfuro erróneos. La ruta de isomerización llevada a cabo por el complejo DsbC-DsbD

cataliza el reordenamiento de los enlaces disulfuro erróneos, permitiendo un correcto plegamiento de las proteínas (Gruber *et al.*, 2006).

En eucariotas, las cadenas de polipéptidos sintetizadas cuyo destino es la ruta de secreción son llevadas al retículo endoplasmático (ER) mediante señales de reconocimiento y receptores, donde se llevará a cabo su plegamiento y modificación (van Anken y Braakman, 2005). Cada enlace disulfuro introducido en una proteína dentro del ER requiere de la eliminación de dos electrones a través de compuestos de bajo peso molecular o mediante catálisis enzimática. Los compuestos que pueden actuar como oxidantes incluyen glutatión, dehidroascorbato y vitamina K epóxido, compuestos que pueden ser generados o introducidos en el ER (Thorpe *et al.*, 2002). La familia de proteínas PDI cataliza la oxidación de grupos sulfidrilo de proteínas sustrato en el ER, luego las proteínas PDI son oxidadas por las sulfidril oxidasas Ero1- $L\alpha$ y Ero1- $L\beta$ en mamíferos, AERO1 y AERO2 en plantas y Ero1p y Erv2 en levaduras (Gruber *et al.*, 2006). Finalmente las oxidoreductasas reducen el oxígeno molecular a través del cofactor FAD (Figura 1.15).

De los estudios llevados a cabo en levaduras se ha estimado que aproximadamente un tercio del total de proteínas eucarióticas pasa a través del ER durante su maduración. Entre ellas se incluyen todas las proteínas de membrana plasmática, las secretadas al periplasma y las proteínas presentes en los compartimentos de la vía de endo y exocitosis (van Anken y Braakman, 2005).

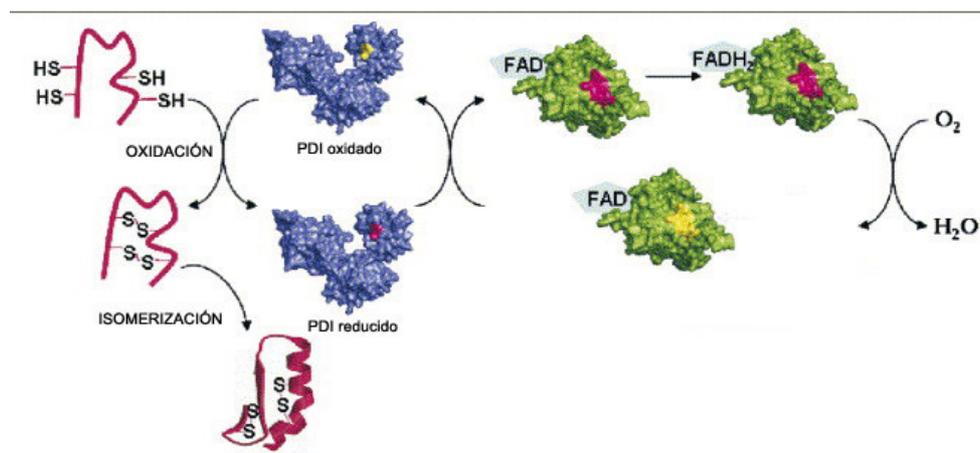
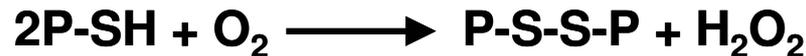


Figura 1.15 Plegamiento oxidativo de proteínas en el ER de eucariotas. El PDI oxidado (azul) actúa formando enlaces disulfuro en el plegamiento oxidativo (oxidación) de proteínas reducidas (rojo). El PDI reducido puede reordenar enlaces disulfuro (isomerización). El PDI es reoxidado por una sulfidril oxidasa (verde) a través de una reacción de intercambio molecular de grupos sulfidrilo, y los electrones son transferidos al oxígeno molecular mediante el cofactor FAD. Modificado de Gruber *et al.*, 2006.

1.11.1 Familia de las sulfidril oxidasas

Existen 2 tipos de sulfidril oxidasas. Por un lado tenemos las sulfidril oxidasas dependientes de metales (metaloenzimas) y por otro las sulfidril oxidasas dependientes de flavina. Ambas catalizan la formación de enlaces disulfuro en proteínas reducidas usando oxígeno molecular como aceptor final de electrones:



Sulfidril oxidasas dependientes de metales

La primera metaloenzima en ser purificada fue una sulfidril oxidasa dependiente de hierro encontrada en la leche desnatada de vacuno (Janolino y Swaisgood, 1975). Esta enzima es una proteína asociada a membrana que oxida algunas enzimas como quimotripsinógeno y ribonucleasa reducida (Janolino y Swaisgood, 1987). En contraste, la sulfidril oxidasa de piel es dependiente de cobre (Yamada *et al.*, 1989) y ha recibido mucha atención por su papel en la maduración de la dermis, su posible participación en la formación del pelo y por su participación en enfermedades de la piel (Hashimoto *et al.*, 2001), pero un estudio posterior demostró que esta sulfidril oxidasa pertenece a la familia QSOX y no es dependiente de cobre (Matsuba *et al.*, 2002).

En células epiteliales de intestino de rata (Lash y Jones, 1983) y en linfocitos de ratón (Roth y Koshland, 1981) también se han encontrado sulfidril oxidasas dependientes de cobre pero no se tiene actualmente información de su estructura o secuencia de proteínas.

Flavina sulfidril oxidasas

Entre las principales flavina sulfidril oxidasas tenemos Erv1p, Erv2p y Ero1p de *S. cerevisiae* (Frand y Kaiser, 1999, Lee *et al.*, 2000, Gross *et al.*, 2002) Ero1-La, Ero1-L β y ALR1 de mamíferos (Cabibbo *et al.*, 2000, Pagani *et al.*, 2000, Lisowsky *et al.*, 2001) y finalmente, AERO1, AERO2 y AtErv1 de *A. thaliana* (Dixon *et al.*, 2003, Levitan *et al.*, 2004). Estas flavina sulfidril oxidasas se pueden dividir en 2 subgrupos según sus dominios proteicos.

Por un lado tenemos las flavina sulfidril oxidasas con un dominio ERV/ALR (Erv1p, Erv2p, ALR1 y AtErv1) que se caracterizan por ser moléculas pequeñas (20-22 kDa), tener un

sitio de unión a FAD y presentar una región de aproximadamente 100 aa que contiene el centro redox activo (**YPCxxC²**), el sitio de unión a FAD (**HNxVNxrL**) y un par de cisteínas separadas entre si por 16 aa (**C-X₁₆-C**). Además estas enzimas se ubican tanto en mitocondria como en retículo endoplasmático donde participan en la formación de enlaces disulfuro mediante la oxidación de las proteínas PDI y la formación de peróxido de hidrógeno (Sevier *et al.*, 2001, Levitan *et al.*, 2004, Coppock y Thorpe, 2006). También existen homólogos de este grupo de flavina sulfidril oxidasas en virus como *Vaccinia*, ASFV (Virus de la peste porcina africana) y PBCV (Paramecium Bursaria Chlorella virus) (Thorpe *et al.*, 2002). En *Vaccinia* se ha descubierto que la sulfidril oxidasa E10 (con dominio ERV/ALR), la proteína asociada A2.5L y la proteína G4L, similar a tioredoxina, componen la ruta para la síntesis citoplasmática de enlaces disulfuro para proteínas de la cubierta (White *et al.*, 2002, Senkevich *et al.*, 2002).

El otro grupo son las proteínas Ero (Ero1p, Ero1-L α , Ero1-L β , AERO1 y AERO2) que tienen un mayor tamaño (50-60 kDa) y presentan 7 cisteínas conservadas en su estructura, 3 de ellas formando el dominio **CxxCxxC** (Frاند y Kaiser, 2000, Hiniker y Bardwell, 2004), además presenta un sitio de unión a FAD diferente al dominio **HnxVNxrI** (Tu *et al.*, 2000, Gross *et al.*, 2004). Estas enzimas se ubican en ER y catalizan la oxidación de PDI teniendo como aceptor final de electrones al oxígeno molecular (Frاند y Kaiser, 1999, Fassio y Sítia, 2002, Hiniker y Bardwell, 2004). Las proteínas ERO se encuentran en plantas, animales, hongos y protistas pero no se encuentran en bacterias (Thorpe *et al.*, 2002).

Durante la evolución de los eucariotas, se produjo la fusión del dominio catalítico ERV/ALR con un dominio tioredoxina, generando un nuevo grupo de enzimas para la formación de enlaces disulfuro con una mayor actividad enzimática. El primer gen identificado que codificaba esta nueva proteína se llamo Quiescina Q6 (QSCN6) ya que fue encontrado en fibroblastos humanos que entran en quiescencia (Coppock *et al.*, 1993, Coppock, *et al.*, 1998). Posteriormente se observó que la proteína QSCN6 presentaba homología con una flavina sulfidril oxidasa de clara de huevo y otra de vesícula seminal de rata por lo que se definió una nueva clase de flavina sulfidril oxidasas llamada QSOX (Hoover *et al.*, 1999a, Benayoun *et al.*, 2001).

² Las letras en mayúsculas indican que el aminoácido esta conservado, las letras en minúscula indican que el aminoácido es el mayoritario en la secuencia consenso y la letra x indica que puede ser cualquier aminoácido.

1.11.2 Familia de sulfidril oxidasas QSOX

Los genes que codifican las proteínas QSOX están ampliamente distribuidos en eucariotas, donde al menos un gen ortólogo ha sido encontrado en todas las plantas y metazoos. Incluso varios protozoos involucrados en enfermedades humanas como *P. falciparum* (malaria), *T. brucei* (enfermedad del sueño), *L. major* (leishmaniasis) y *C. parvum* (criptosporidiosis) tienen una copia de un gen similar a QSOX (Coppock y Thorpe, 2006). Es importante mencionar que no se han encontrado ortólogos en hongos aunque si presentan flavina sulfidril oxidasas con dominios ERV/ALR y ERO (Thorpe *et al.*, 2002, Coppock y Thorpe, 2006).

Las proteínas QSOX poseen un péptido señal, un dominio tioredoxina (TRX) próximo al N-terminal y un dominio cercano al C-terminal que es homólogo a ERV/ALR donde se encuentra el sitio de unión a FAD (Raje y Thorpe, 2003). Particularmente, todas las proteínas QSOX de metazoos muestran una estructura de dominios muy similar con la presencia de 2 dominios TRX fusionados. En cambio, las plantas y protozoos tienen las proteínas QSOX más cortas y solo presentan un dominio TRX (Houston *et al.*, 2005, Coppock y Thorpe, 2006). Algunos de los miembros de la familia QSOX en vertebrados como *Xenopus*, pez cebra, gallina, ratón y humanos muestran una tercera región conservada en la región C-terminal llamada zona 10 de homología a QSOX (QH10) (Thorpe *et al.*, 2002). Finalmente todos los miembros de la familia QSOX presentan una región separadora con estructura helicoidal entre los dominios TRX y ERV/ALR (Coppock y Thorpe, 2006).

Las proteínas QSOX más estudiadas hasta la fecha son las de humanos (HsQSOX1 a.k.a. QSCN6 y HsQSOX2 a.k.a. SOXN), rata (rQSOX), clara de huevo de aves (QSOX1), cobaya (CpQSOx1) y piel de ratón (Matsuba *et al.*, 2002, Raje y Thorpe, 2003, Wittke *et al.*, 2003, Amiot *et al.*, 2004, Radom *et al.*, 2006).

Estructura de la secuencia proteica

La organización típica de los dominios y estructuras de las enzimas QSOX en metazoos y plantas se muestra en la figura 1.16. Las enzimas QSOX empiezan con una secuencia señal que localiza a la proteína en la vía de secreción a través del ER, después se encuentra un dominio TRX que contiene un motivo redox **CxxC** (en la familia QSOX es **wCgxC**). En los metazoos se encuentra un segundo dominio con poca homología a tioredoxina (TRX2) que carece del motivo **CxxC** (Figura 1.16). Seguidamente se encuentra

una region separadora de aproximadamente 270 aa que no presenta homología con ningún dominio, pero los últimos 50 aa cercanos al dominio ERV/ALR poseen un 35% de identidad con una porción extracelular de un transportador de péptidos de alta afinidad de *C. elegans*. Estos aminoácidos podrían actuar en proteínas QSOX como sitios de reconocimiento para péptidos y proteínas sin plegar (Coppock y Thorpe, 2006).

Los dominios ERV/ALR son más similares entre las proteínas QSOX que entre las proteínas ERV/ALR (Coppock *et al.*, 1998). En este dominio ERV/ALR se ubican 3 regiones conservadas en todas las proteínas QSOX (Figura 1.16). La primera región conservada es un motivo redox **CxxC** identificado en aves (Hooper *et al.*, 1999a) que forma parte de la secuencia consenso **ffxCxdCxxhF**. La segunda región conservada es el motivo **HNxVNxrl** que interactúa con la región ADP del cofactor FAD (Gross *et al.*, 2002). Finalmente la tercera región conservada es otro motivo redox **CxxC** que pertenece a la secuencia consenso **elCxxC** y que no se encuentra en la familia de proteínas ERV/ALR (Coppock y Thorpe, 2006).

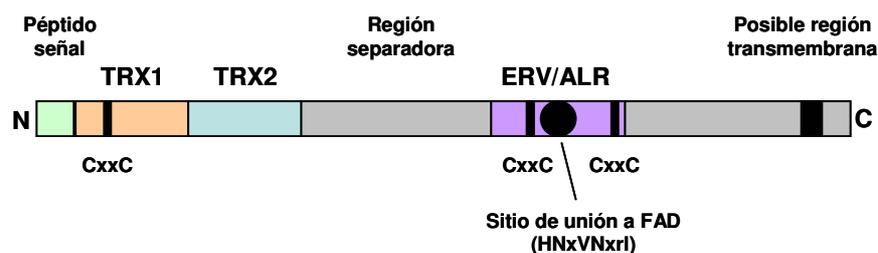


Figura 1.16 Representación esquemática de la estructura de dominios de las proteínas QSOX. Las líneas negras verticales representan los tres motivos redox CxxC, el rectángulo negro representa el posible segmento transmembrana y el círculo negro representa el sitio de unión a FAD. Los dominios son mostrados a escala.

Después del dominio ERV/ALR se ubica una segunda región separadora muy variable de cerca de 200 aa que contiene una posible región transmembrana. Existen genes de la familia QSOX que presentan diferentes transcritos (“splice variant”) que difieren en la presencia de un intrón en el ultimo exón. El “splice variant” se presenta en los genes *rQSOX* y *HsQSOX1* (Coppock y Thorpe, 2006, Radom *et al.*, 2006). Finalmente ninguna proteína QSOX presenta la secuencia **KDEL** de retención en ER, aunque la proteína QSOX1 de aves presenta la secuencia **FRLRTRARKGR** que es consistente con 3 copias **RxR** de una secuencia de retención en ER basada en arginina (Zerangue *et al.*, 2001, Coppock y Thorpe, 2006).

Roles de los dominios en la formación de enlaces disulfuro

Por medio de una proteólisis parcial con quimiotripsina se cortó la proteína QSOX1 de aves en 2 fragmentos: la porción N-terminal que contiene ambos dominios TRX y que no presenta actividad sulfhidril oxidasa, y la porción C-terminal con el dominio ERV/ALR que mantiene la unión a FAD pero muestra una muy baja actividad sulfhidril oxidasa con el sustrato DTT y no muestra actividad sulfhidril oxidasa con RNAasa reducida (Raje y Thorpe, 2003). Además, se demostró que la porción conteniendo el dominio TRX reducido es sustrato del fragmento con el dominio ERV/ALR (Raje y Thorpe, 2003). Este dato es muy importante ya que pone de manifiesto la ventaja catalítica que las proteínas QSOX poseen como consecuencia de tener fusionado el dominio tioredoxina a un dominio ERV/ALR oxidasa (Coppock y Thorpe, 2006).

El inicio de la catálisis de la proteína QSOX empieza con la oxidación de dos grupos sulfhidrilo del sustrato a través del motivo redox **CxxC** (**C₈₀xxC₈₃** en QSOX1 de aves), ubicado en el dominio TRX1, que queda así reducido (Figura 1.17, paso 1). A partir de este punto se inician una serie de oxidoreducciones de grupos sulfhidrilo que tienen como aceptor final de electrones el cofactor FAD (Figura 1.17, pasos 2-4). La comprensión de estos pasos de oxidoreducción se logró mediante el descubrimiento de la estructura tridimensional de la proteína ScErv2p (Figura 1.18.A), donde se observó que el motivo distal **CxC** de la región flexible C-terminal de cada subunidad dimérica de ScErv2p podría interactuar con el PDI (PDI1p) reducido de levaduras y que al sobreexpresar *PDII* y *ScERV2* se produce un enlace disulfuro entre ellos (Sevier *et al.*, 2001, Gross *et al.*, 2002). Un motivo redox **CxxC** localizado en una región similar se ha encontrado en todos los miembros QSOX (**C₅₁₉xxC₅₂₂** en QSOX1 de aves) y probablemente es el aceptor de los electrones del motivo redox del dominio TRX1 (Figura 1.17, paso 2). La reducción del tercer motivo redox **CxxC** (**C₄₅₉xxC₄₆₂** en QSOX1 de aves) se produciría de manera similar a la reducción del motivo cercano **CxxC** en ScErv2p (Figura 1.17, paso 3 y Figura 1.18.B) es decir, mediante enlaces disulfuro entre subunidades (Sevier *et al.*, 2001, Gross *et al.*, 2002), por lo tanto, la forma activa de la proteína QSOX tendría que ser dimérica (Coppock y Thorpe, 2006).

El motivo **C₄₅₉xxC₄₆₂** reducido participa en la reducción de una flavina oxidada (Figura 1.17, paso 4), ya que como se ha visto en numerosas flavoenzimas, el grupo prostético flavina está en contacto con motivos redox disulfuro (Coppock y Thorpe, 2006). Finalmente, la catálisis es completada con la interacción del FAD reducido y el oxígeno molecular (Figura

1.17, paso 5) para generar peróxido de hidrógeno. Tal reacción requiere un ambiente polar adecuado cercano a la flavina para estabilizar el anión superóxido y un espacio para acomodar el intermediario C-4a-hidroperoxiflavina generado durante la formación de peróxido (Wang y Thorpe, 1991, Massey, 1994). Este lugar ha sido identificado como un canal en la proteína ScErv2 a través del cual el oxígeno puede llegar al anillo de isoaloxazina (Gross *et al*, 2002).

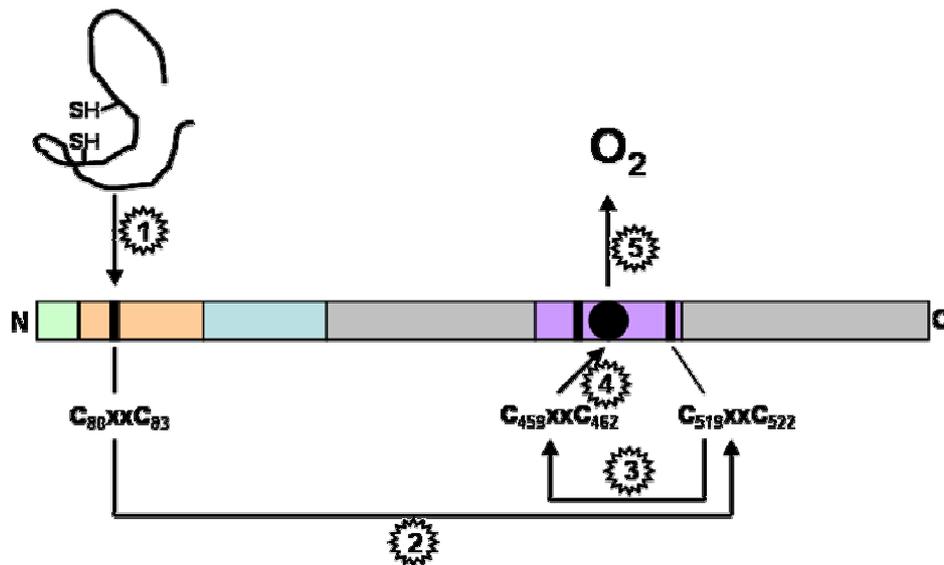


Figura 1.17 Esquema de la serie de reacciones de oxidoreducción propuesto para la catálisis de QSOX en aves. Las líneas negras verticales representan los tres motivos redox CxxC y el círculo negro representa el sitio de unión a FAD. Los dominios son mostrados a escala.

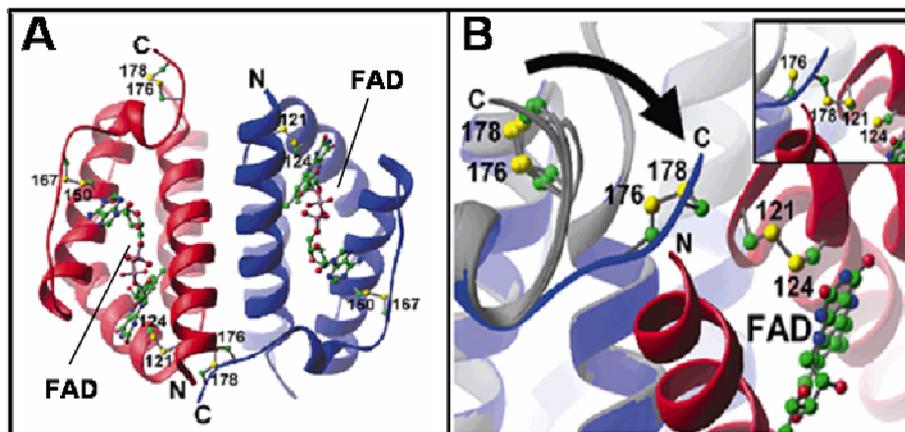


Figura 1.18 Estructura de ScErv2p. A. Estructura tridimensional de la proteína ScErv2p activa formando un dímero (protómero azul y protómero rojo). B. Extremo C-terminal flexible de ScErv2p donde la flecha indica el cambio conformacional del extremo que se produce para que se acerquen los motivos redox. En la esquina superior derecha se muestra el enlace disulfuro originado por este acercamiento. Los residuos de cisteínas se muestran numerados y en forma de bolas y barras. El N y C-terminal de cada cadena es mostrado como N y C respectivamente. (Gross *et al.*, 2002).

Localización y función de las proteínas QSOX

Por medio de análisis de RT-PCR e inmunohistoquímica se ha podido conocer la localización de las proteínas QSOX en humanos, cobayas y ratas, donde se han sugerido varias funciones posibles (Coppock y Thorpe, 2006). En humanos, los niveles de expresión de *HsQSOX1* y *HsQSOX2* varían según el tejido analizado, lo que indicaría que los 2 genes tienen funciones diferentes o funciones redundantes según los tejidos estudiados (Coppock *et al.*, 1998, Wittke *et al.*, 2003).

HsQSOX1 se ha encontrado en los islotes de Langerhans del páncreas y se presume que estaría involucrado en la maduración y plegamiento de la insulina (Thorpe *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha visto en ratas que la proteína rQSOX se expresa solo en las células α de los islotes de Langerhans donde se produce glucagón (no contiene enlaces disulfuro) pero no se expresa en las células β donde se produce la insulina (contiene enlaces disulfuro), por lo que es probable que la insulina no sea sustrato de QSOX y se ha planteado que el sustrato de QSOX en las células α pueda ser la hormona estaniocalcina 2, que presenta 15 residuos de cisteína (Moore *et al.*, 1999, Tury *et al.*, 2006). La proteína HsQSOX1 se ha localizado también en la glándula parótida, en las glándulas apócrinas de la piel y en las células del intestino delgado secretoras de péptidos y proteínas, así como en otros tejidos donde existe una alta demanda de péptidos y proteínas secretadas con enlaces disulfuro como la glándula pituitaria, el epitelio pulmonar, la placenta que secreta gonadotropina coriónica y células del plasma que sintetizan inmunoglobulinas (Thorpe *et al.*, 2002, Coppock y Thorpe, 2006).

Se ha identificado a la proteína HsQSOX2 como un regulador en la inducción de apoptosis producida por IFN- γ (interferon-gamma) en células de neuroblastoma, donde podría participar en la regulación redox de factores de transcripción (Wittke *et al.*, 2003). Los altos niveles de expresión y la localización específica de HsQSOX2 en algunos tejidos sugiere que su función como regulador de la muerte celular no esta restringida solo a neuroblastomas y también es probable que esta proteína tenga funciones adicionales no relacionadas con la apoptosis (Wittke *et al.*, 2003).

En cobayas la expresión de la proteína CpQSOx1 esta ampliamente distribuida en el sistema nervioso central y podría estar asociada a gránulos de secreción presentes en neuronas (Amiot *et al.*, 2004). Además, puede participar en las interacciones célula-célula liberándose, junto con los neurotransmisores, en los sitios de sinapsis para reforzar las uniones sinápticas

(Amiot *et al.*, 2004). En estructuras reticulares del cerebro tales como la base del prosencéfalo, el núcleo talámico reticular y el tronco del encéfalo se observa una alta expresión de CpQSOx1 que podría estar involucrado en la regulación de procesos biológicos mediante la oxidación de receptores de membrana o proteínas excretadas así como de proteínas de la matriz extracelular (Amiot *et al.*, 2004). Además se ha encontrado una disminución en la expresión de proteínas QSOX en respuesta a estrógenos en humanos y cobayas, sugiriendo que esta proteína participa en la maduración de proteínas con enlaces disulfuro involucradas en la resistencia al cáncer de mama (Musard *et al.*, 2001, Inoue *et al.*, 2002, Imai *et al.*, 2005).

La proteína rQSOX de rata se localiza mayoritariamente en células epiteliales de diferentes órganos y tejidos especializadas en secreción, observándose el mayor nivel de expresión en glándulas secretoras y en el sistema reproductivo del macho (Tury *et al.*, 2005). Se han propuesto varias funciones y sustratos para la proteína rQSOX dependiendo del tejido donde se exprese. En las glándulas salivales rQSOX podría estar involucrado en la formación de enlaces disulfuro en mucinas, principales componentes de la mucosa (Tury *et al.*, 2006). También participaría en la formación de enlaces disulfuro de la hormona luteinizante y/o la hormona estimulante del folículo en la adenohipófisis (Tury *et al.*, 2006). En el epitelio estratificado que cubre la piel y el esófago, rQSOX está localizado específicamente en la capa granular por lo que podría jugar un rol importante en el mantenimiento de la estructura de la epidermis, catalizando la introducción de enlaces disulfuro en proteínas precursoras como loricrina e involucrina (Tury *et al.*, 2006). En los tubos seminíferos, rQSOX estaría involucrado en la maduración de las células germinales mediante una regulación redox que se ha visto que es crucial en la fisiología y función del espermatozoide (Baker y Aitken, 2004, Tury *et al.*, 2006). Además se ha propuesto que podría servir como un marcador de la eficiencia espermatogénica y de diagnóstico de infertilidad masculina (Bergmann *et al.*, 1992). Finalmente en las glándulas suprarrenales, rQSOX está ubicada exclusivamente en las células catecolaminérgicas, indicando que podría tener un papel específico en el metabolismo de adrenalina (Tury *et al.*, 2006).

Se ha planteado que la generación colateral de peróxido de hidrógeno en el espacio extracelular, debido a la catálisis de glutatión por las proteínas QSOX junto con las peroxidasas extracelulares, podría tener efecto antimicrobiano pero no se ha comprobado experimentalmente (Ostrowski y Kistler, 1980, Coppock y Thorpe, 2006). Además del posible efecto antimicrobiano, el peróxido de hidrógeno generado por QSOX en células

neuronales puede intervenir en la trasducción de señal (Mairet-Coello *et al.*, 2004). Así también tenemos que una expresión desregulada de proteínas QSOX llevaría a un exceso de peróxido de hidrógeno que provocaría procesos degenerativos (como apoptosis) en las células y neuronas (Amiot *et al.*, 2004).

A nivel celular, los primeros estudios de proteínas QSOX mostraron que estas proteínas se encuentran en el espacio extracelular, ya sea de forma secretada o anclada en la membrana plasmática mediante el segmento transmembrana, lo cual concuerda con la localización de la proteína según la secuencia de su péptido señal (Coppock y Thorpe, 2006). Sin embargo, también se han encontrado proteínas QSOX dentro de las células, ya sea en vesículas o en compartimentos celulares como ER (Thorpe *et al.*, 2002, Tury *et al.*, 2004), aparato de Golgi (Thorpe *et al.*, 2002, Mairet-Coello *et al.*, 2004, Tury *et al.*, 2004), gránulos de secreción (Mairet-Coello *et al.*, 2004, Tury *et al.*, 2004) y gránulos densos de pituitaria (Tury *et al.*, 2004). También se ha encontrado QSOX en el núcleo celular (Wittke *et al.*, 2003) y en la matriz mitocondrial durante el desarrollo de células testiculares de mamíferos (Bergmann *et al.*, 1990, Benayoun *et al.*, 2001).

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de esta tesis es la identificación, aislamiento y caracterización de componentes genéticos involucrados en la tolerancia al estrés salino en *A. thaliana*. Para conseguir este fin, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos

- Aislamiento de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con mayor tolerancia a norespermidina.
- Caracterización fenotípica de la línea seleccionada e identificación del *locus* mutante.
- Análisis genético del mutante resistente a norespermidina.
- Clonación y caracterización del gen *AtQSO2*.
- Determinación del mecanismo de resistencia a cationes tóxicos producido por el gen *AtQSO2*.

Materialles y Métodos

3.1 Material biológico

3.1.1 *Arabidopsis thaliana*

Para este trabajo se emplearon líneas mutantes por inserción de T-DNA construidas en el laboratorio del Dr. Detlef Weigel (The Salk Institute for Biological Studies, California) utilizando el vector de transformación pSKI015 (Weigel *et al.*, 2000). Inicialmente, 850 de estas líneas fueron donadas directamente por el Dr. Weigel al *European Arabidopsis Stock Center* (NASC) y posteriormente 7700 líneas adicionales fueron donadas por el Dr. Michael Sussmann (University of Wisconsin, Madison); este constituye el primer set (N21995) que se dividió en 86 grupos de 100 líneas mutantes cada uno. El segundo set (N21991) fue una segunda donación hecha por el Dr. Weigel que consiste en 7848 líneas divididas en 82 grupos de 96 líneas cada uno. Cada grupo de los 2 sets contenía aproximadamente 10 semillas por línea mutante. Las líneas son distribuidas como generación T₄ en el fondo genético *Columbia* (*Col-7*).

Cada grupo de líneas mutantes se analizó individualmente, llamando al total de semillas de las 16398 líneas población S₀ (de Selección), posteriormente a la primera generación seleccionada por su resistencia se le llamo S₁, la siguiente S₂ y así sucesivamente.

El vector pSKI015 (Figura 3.1) usado en la transformación contiene, desde el borde izquierdo (LB) hasta el borde derecho (RB) del T-DNA, las siguientes partes:

- El gen de resistencia al herbicida glufosinato, también conocido como BASTA (gen *BAR*), que es regulado por el promotor de la manopina sintasa (*MAS*). Este gen permite la selección en tierra y en medio de cultivo de las líneas mutantes.
- El plásmido pBluescriptKS+ (Stratagene) que contiene el gen bacteriano de resistencia al antibiótico ampicilina. Este plásmido permite realizar el rescate plasmídico para la localización de la inserción de T-DNA dentro del genoma de la planta usando los sitios de restricción únicos *EcoR* I y *BamH* I.
- 4 copias en tándem del activador transcripcional 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), cuya función teórica es aumentar la expresión de los genes de la planta localizados cerca de la inserción de T-DNA.

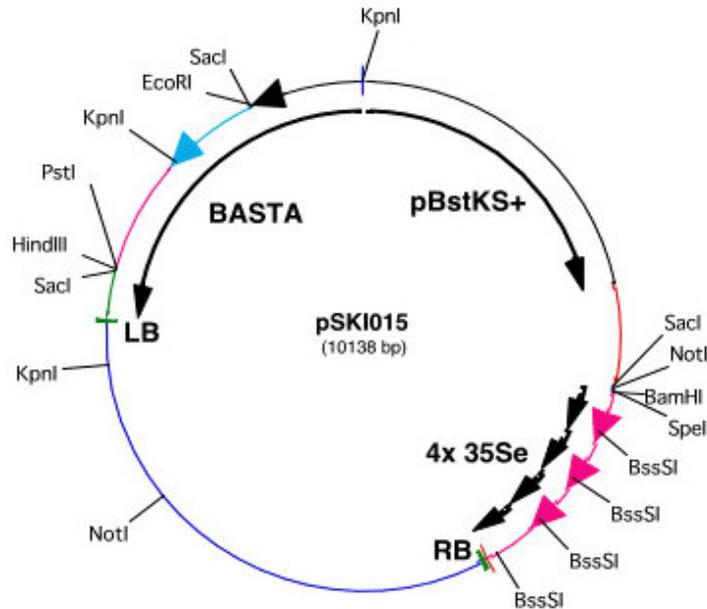


Figura 3.1 Esquema del vector pSKI015 empleado en la generación de las líneas mutantes de T-DNA (Weigel *et al.*, 2000)

Los ecotipos y mutantes utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

Columbia (Col-7): Fue suministrado por el NASC con el número de lote N3731 y se usó como ecotipo silvestre.

Wassilewskija (Ws): Proviene del *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) con número de lote CS1601. Se ha empleado como ecotipo silvestre del mutante *akt1-1*.

***upr1-1*:** Alelo mutante del locus At1g15030, suministrado por el NASC con el número N578313. Se encuentra en el fondo *Col* y fue obtenido por inserción de T-DNA.

***par1-2*:** Alelo mutante del locus At1g15020, suministrado por el NASC con el número N566130. Se encuentra en el fondo *Col* y fue obtenido por inserción de T-DNA.

***par1-3*:** Alelo mutante del locus At1g15020, suministrado por el NASC con el número N525237. Se encuentra en el fondo *Col* y fue obtenido por inserción de T-DNA.

***par1-4*:** Alelo mutante del locus At1g15020, suministrado por el NASC con el número N572829. Se encuentra en el fondo *Col* y fue obtenido por inserción de T-DNA.

***qsol-1*:** Alelo mutante del locus At2g01270, suministrado por el NASC con el número N545918. Se encuentra en el fondo *Col* y fue obtenido por inserción de T-DNA.

***qsol-2*:** Alelo mutante del locus At2g01270, suministrado por el NASC con el número N544951. Se encuentra en el fondo *Col* y fue obtenido por inserción de T-DNA.

akt1-1: Alelo mutante del *locus* At2g26650, suministrado por el NASC con el número N3762. Se encuentra en el fondo *Ws* y fue obtenido por inserción de T-DNA

skor1-2: Alelo mutante del *locus* At3g02850 suministrado por el NASC con el número N632944. Se encuentra en el fondo *Col* y fue obtenido por inserción de T-DNA

3.1.2 *Nicotiana benthamiana*

Se usaron semillas silvestres provenientes de UNIFARM (Wageningen University)

3.1.3 *Escherichia coli*

Se usaron las siguientes cepas:

XL1-Blue MRF[']: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\Delta}Z\Delta M15 \text{ Tn10 (Tetr)]}$. Empleada como cepa de transformación (electroporación) en el rescate plasmídico.

DH5 α : F['] $\phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 \text{ recA1 endA1 hsdR17}(r_k^-, m_k^+) \text{ phoA supE44 } \lambda \text{ thi-1 gyrA96 relA1}$. Empleada como cepa convencional de transformación (choque térmico) de plásmidos recombinantes.

3.1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Para desarrollar este trabajo se utilizó el hongo unicelular *S. cerevisiae* perteneciente al *phylum* de los Ascomicetos, ampliamente utilizado como modelo para organismos eucariotas. Se usó la cepa W303-1A: *MATa can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 GAL⁺* para la expresión de proteína recombinante y las cepas PLY232 (*MATa his3 Δ 200 leu2-3,112 trp1 Δ 901 ura3-52 suc2 Δ 9*) y PLY240 (*MATa his3 Δ 200 leu2-3,112 trp1 Δ 901 ura3-52 suc2 Δ 9 trk1 Δ 51 trk2 Δ 50:: lox-KanMX-lox*), ambas cepas en el fondo genético JRY399 (Ljungdahl del Ludwi, Institute of Stockholm), para el análisis de coexpresión. PLY232 se usa como cepa silvestre (*wt*).

3.1.5 *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó la cepa GV3101 C58C1 que contiene el plásmido T_i desarmado pGV2260 (Amp^r). Empleada como cepa de transformación de *A. thaliana* y *N. benthamiana*.

3.1.6 Vectores de clonación y transformación

pBluescriptSK(+): (Stratagene) Plásmido multicopia empleado como vector convencional de clonación (Figura 3.2). Posee un sitio de clonación múltiple (MCS), el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el fragmento *lacZα* para confirmar la presencia del inserto en el sitio de clonación.

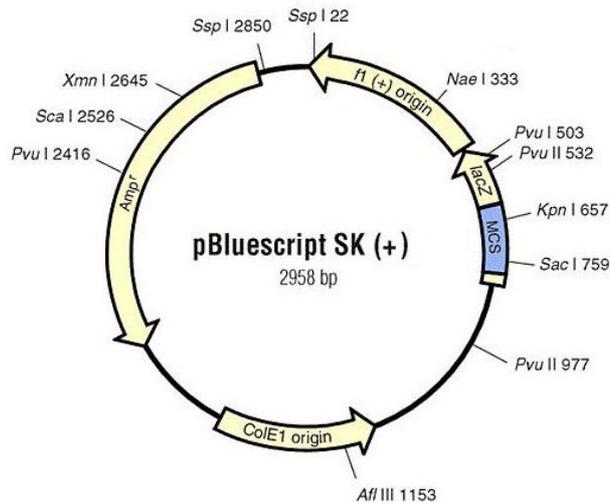


Figura 3.2 Esquema del plásmido pBluescript SK (+)

pRS421: Plásmido multicopia usado para el análisis de coexpresión (Figura 3.3) derivado de YEp351 (Hill *et al.*, 1986), donde está insertada la región promotora y terminadora del gen *PMA1*. Posee un único sitio de clonación (*Xho* I), el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el gen *LEU2* de levadura.

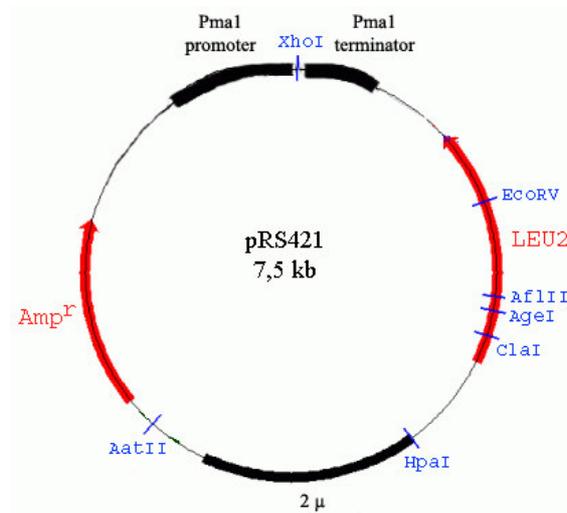


Figura 3.3 Esquema del plásmido pRS421

pYPGE15: Plásmido multicopia usado para el análisis de coexpresión (Figura 3.4). Contiene la región promotora del gen *PGK* y la región terminadora del gen *CYC1*. Además posee un sitio múltiple de clonación (polylinker), el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el gen *URA3* de levadura.

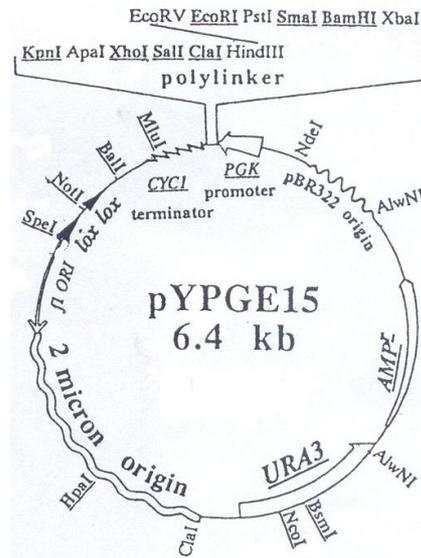


Figura 3.4 Esquema del plásmido pYPGE15

pBI121: Plásmido binario utilizado en la transformación de *A. thaliana* y *N. benthamiana* (Figura 3.5) y derivado de pBIN19 (Bevan, 1984). En la región comprendida entre las zonas LB y RB (T-DNA) contiene el gen delator *GUS* bajo el control del promotor 35S y la región terminadora del gen de la nopalina sintasa (*NOS*), además el T-DNA tiene el gen *NPT II* que confiere resistencia a kanamicina.

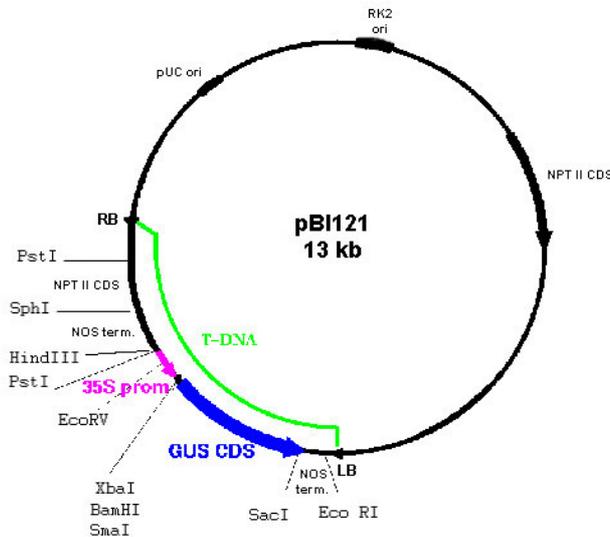


Figura 3.5 Esquema del plásmido pBI121

pCAMBIA1300: Plásmido binario derivado del plásmido pPZP (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) utilizado en la transformación de *A. thaliana* (Figura 3.6). En la región comprendida entre las zonas LB y RB (T-DNA) contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) derivado del plásmido pUC18 y el gen *HPTII* que da resistencia a higromicina.

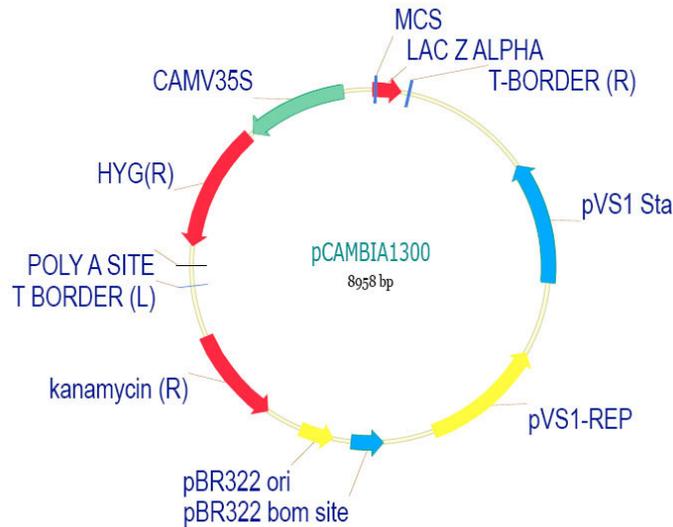


Figura 3.6 Esquema del plásmido pCAMBIA1300

pCM262: Plásmido multicopia utilizado para la expresión y aislamiento de proteína recombinante en *S. cerevisiae* (Figura 3.7) derivado del plásmido pCM190 (Gari *et al.*, 1997). Contiene un MCS que permite clonar un gen en pauta de lectura con 6 histidinas y 3 copias del epítipo HA bajo el control de un promotor regulable por tetraciclina (*tetO-CYC1*). Además presenta el gen bacteriano de resistencia a ampicilina y el gen *URA3* de levadura.

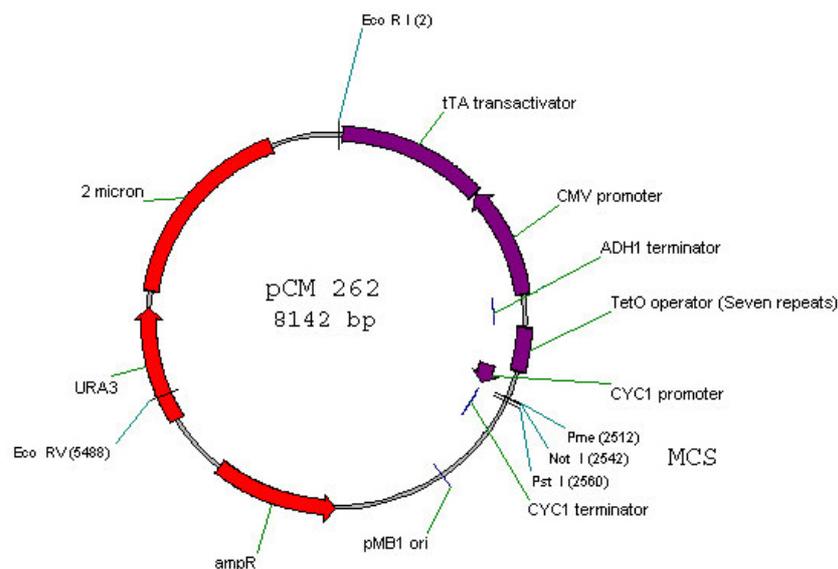


Figura 3.7 Esquema del plásmido pCM262

3.2 Medios de cultivo y solución nutritiva

En todos los casos los medios se esterilizaron en un autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 1 atmósfera de presión. Las sustancias termolábiles como tetraciclina, kanamicina, higromicina B, norespermidina, espermina, espermidina, putrescina, ácido abscísico y peróxido de hidrógeno se adicionaron en las concentraciones indicadas al medio de cultivo ya estéril y enfriado por debajo de los 50 °C. Los medios sólidos se conservaron a 4 °C y los medios líquidos a temperatura ambiente.

3.2.1 Medios para crecimiento de *Arabidopsis*

Medio Murashige-Skoog (MS)

Medio empleado de forma rutinaria para el crecimiento de *Arabidopsis*. Está compuesto por sales MS (Sigma), 1% o 3% (p/v) de sacarosa y 10 mM de MES; se ajustó el pH a 5,7 con HCl y en el caso de preparar medio sólido se agregó 8 g/l de agar (Pronadisa).

Medio con K⁺ limitante

Medio utilizado para el crecimiento de *Arabidopsis* a bajas concentraciones de K⁺ y para los ensayos de toma de rubidio. Para ello se reemplazaron las sales MS por una solución de macro y micronutrientes con la siguiente composición: 2,5 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 2 mM NH₄H₂PO₄, 0,1 mM NaFeEDTA, 80 μM Ca(H₂PO₄)₂, 25 μM CaCl₂, 25 μM H₃BO₃, 2 μM ZnSO₄, 2 μM MnSO₄, 0,5 μM CuSO₄, 0,5 μM Na₂MoO₄, 0,01 μM CoCl₂; 1% de sacarosa y 2,5 mM de MES. El pH fue ajustado a 5,7 con Tris-base. El potasio fue agregado a las concentraciones indicadas como KCl. En el caso de preparar medio sólido se agregó 8g/l de agarosa (Pronadisa) por su mayor pureza y muy bajo contenido en K⁺.

3.2.2 Medios para crecimiento de bacterias

En el caso del medio LB, los antibióticos se agregaron a las siguientes concentraciones: ampicilina (100 mg/l), kanamicina (50 mg/l) y tetraciclina (13 mg/l).

Medio Luria-Bertani (LB)

Medio empleado para el crecimiento de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Está compuesto por 1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl. El pH fue ajustado a 7,2 con NaOH, para preparar medio sólido se agregaron 20 g/l de agar.

Medio SOC

Medio empleado para crecer las células de *E. coli* y *A. tumefaciens* después de ser transformadas por electroporación. Está compuesto por 2% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl y 2,5 mM KCl, el pH se ajustó a 7 con NaOH. Después de autoclavar se agregaron soluciones estériles de MgCl₂ y glucosa a una concentración final de 10 y 20 mM, respectivamente.

3.2.3 Medios para crecimiento de *S. cerevisiae*

Medio YPD

Medio usado para el crecimiento de *S. cerevisiae*, está compuesto por 2% (p/v) glucosa, 2% (p/v) triptona y 1% (p/v) extracto de levadura. Para preparar medio sólido se agregan 20 g/l de agar.

Medio SCD

Medio mínimo completo usado para la obtención de colonias transformantes de *S. cerevisiae*; el medio está compuesto por 5% (v/v) de una solución de vitaminas/aminoácidos, 2% (p/v) glucosa, 0,7% (p/v) YNB, 50 mM ácido succínico y 20 g/l de agar. Contiene todos los aminoácidos y bases nitrogenadas salvo los requeridos para la selección de plásmidos.

Medio SD

Medio mínimo usado para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Está compuesto por 2% (p/v) glucosa, 0,7% (p/v) YNB, 50 mM ácido succínico. Para preparar medio sólido se agregan 20 g/l de agar. Los aminoácidos de selección para las auxotrofías se agregan directamente sobre el medio solidificado o en el medio líquido estéril.

3.2.4 Solución nutritiva

Solución de minerales usada para regar las plantas de *N. benthamiana* y para los experimentos de estrés por NaCl y LiCl en *A. thaliana*. Esta compuesta por los siguientes macro y micronutrientes: 4 mM KNO₃, 4 mM Ca(NO₃)₂, 1,5 mM MgSO₄, 0,75 mM KH₂PO₄, 0,035% (w/v) EDTA-FeSO₄, 70 μM H₃BO₃, 14 μM MnCl₂, 0,5 μM CuSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0,2 μM Na₂MoO₄, 10 μM NaCl, 0,01 μM CoCl₂.

3.3 Manipulación y crecimiento de *A. thaliana* y *N. benthamiana*

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* se cultivaron en una mezcla 2:1 de turba (Biolan) : vermiculita (Asfaltex). Las macetas fueron colocadas en bandejas e irrigadas 2 veces a la semana con agua mediante inundación de la bandeja. Las condiciones de crecimiento en el invernadero fueron de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad) a 23 ± 2 °C de temperatura y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa con una intensidad de luz aproximada de $130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$.

Para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana*, las semillas fueron esterilizadas con una solución de etanol al 70% (v/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v) durante 15 minutos en agitación, después se eliminó el etanol, se añadió una solución de lejía al 2,5% (v/v) y Tritón X-100 0,05% (v/v) y se mantuvo en agitación durante 10 minutos. Finalmente se lavaron las semillas 3 veces con agua destilada. La estratificación de las semillas se llevó a cabo colocando las semillas en agua estéril a 4 °C durante 3 días.

Para la germinación de semillas se usaron placas Petri de 9 cm Ø que contenían medio de cultivo MS sólido y fueron selladas con cinta porosa (Micropore). Cuando se realizó el crecimiento de plántulas en medio líquido se dispensó MS líquido en matraces de 50 ml o en placas de cultivo de 6 pocillos (Greiner) con un volumen de 7 ml por pocillo y se colocaron en agitación (90-110 rpm). La incubación de medio MS sólido y líquido se realizó en cámaras con condiciones controladas de 23 °C de temperatura, fotoperiodo de día largo (16:8) e intensidad de luz de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.4 Manipulación y condiciones de crecimiento de *E. coli*

Para el crecimiento en medio líquido de *E. coli* se utilizó un incubador orbital a 37 °C. Los cultivos se crecieron en tubos o matraces estériles en agitación (200-250 rpm) para mantener una aireación adecuada. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se situaron boca abajo en una estufa a 37 °C.

3.4.1 Preparación de células competentes

Células competentes para choque térmico

Se añaden 400 μl de un cultivo saturado de *E. coli* a 200 ml de medio SOB (2% p/v triptona, 0,5% p/v extracto de levadura, 10 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl_2 y 10 mM

MgSO₄) y se incuba a temperatura ambiente hasta una A₆₆₀ de 0,5-0,7. Se recogen las células por centrifugación en frío a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspenden en 10 ml de TB frío (0,48% p/v Pipes, 16 mM CaCl, 170 mM KCl, 40 mM MnCl₂, ajustar a pH 6,7), se vuelve a centrifugar, y se resuspenden las células en 10 ml de TB frío. Finalmente se agregan 750 µl de dimetilsulfóxido y se divide en alícuotas de 100 µl que se guardan a -80 °C.

Células competentes para electroporación

Se inoculan 2 ml de cultivo saturado de *E. coli* en 200 ml de medio LB sin tetraciclina y se incuba a 37° hasta una A₆₆₀ de 0,8. Las células se recogen por centrifugación en frío a 4000 rpm durante 10 minutos, luego las células se lavan 2 veces con agua estéril fría y 1 vez con glicerol frío al 10% (v/v). Finalmente las células se resuspenden en 0,8 ml de glicerol frío al 10%, se distribuyen en alícuotas de 100 µl y se guardan a -80 °C.

3.4.2 Transformación de células competentes

Choque térmico

Se añade el plásmido a transformar a una alícuota de células competentes y se coloca 30 minutos en hielo; seguidamente se realiza una incubación a 42 °C durante 1 minuto e inmediatamente se coloca en hielo durante 2 minutos. Finalmente se agrega 0,9 ml de medio LB, se pone en agitación durante 50 minutos a 37 °C y se extiende las células en una placa de LB con el antibiótico de selección del plásmido.

Electroporación

Se añade el plásmido a transformar a una alícuota de células competentes y la mezcla se coloca en una cubeta para electroporación previamente enfriada de 0,1 cm de separación entre electrodos. La electroporación se realiza utilizando el aparato Gene Pulser (Bio-Rad) a 200 Ω, 25 µF y 1,7 kV. Seguidamente se agregan 0,9 ml de medio SOC, se incuba durante 50 minutos a 37 °C en agitación y se extienden las células en una placa de LB con antibiótico.

3.5 Manipulación y condiciones de crecimiento de *A. tumefaciens*

Para el crecimiento en medio líquido de *A. tumefaciens* se utilizó un incubador orbital a 28 °C. Los cultivos se crecieron en tubos o matraces estériles en agitación (200-250 rpm) para mantener una aireación adecuada. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se situaron boca abajo en una estufa a 28 °C.

3.5.1 Preparación de células competentes

Se inocula 1 ml de cultivo saturado de *A. tumefaciens* en 100 ml de medio LB sin antibiótico y se incuba a 28 °C durante una noche. Luego las células se recogen por centrifugación en frío a 4000 rpm durante 10 minutos y se lavan 2 veces con agua estéril fría, finalmente se resuspenden las células en 4 ml de glicerol frío al 10% (v/v) y se dividen en alícuotas de 0,2 ml que se guardan a -80 °C.

3.5.2 Transformación mediante electroporación

Se agrega el plásmido a transformar a una alícuota de células competentes y la mezcla se coloca en una cubeta de electroporación, previamente enfriada, de 0,2 cm de separación entre electrodos. La electroporación se realiza utilizando el aparato Gene Pulser (Bio-Rad) a 1 k Ω , 25 μ F y 2 kV. Seguidamente, se agregan 0,8 mL de medio SOC, se incuba durante 2-3 horas a 28 °C en agitación y se extienden las células en una placa de LB con el antibiótico de selección.

3.6 Manipulación y condiciones de crecimiento de *S. cerevisiae*

Para el crecimiento a pequeña escala de *S. cerevisiae* en medio líquido (tubos de 10 ml) se utilizó un agitador tipo noria (40-50 rpm) colocado en un incubador a 28 °C. Para el crecimiento a gran escala se utilizaron matraces estériles en un agitador orbital (200-250 rpm) a 28 °C. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se situaron boca abajo en una estufa a 28 °C.

3.6.1 Preparación de células competentes

Se inocula una colonia de células en 50 ml de medio YPD ó SD, se incuba durante una noche y las células se recogen por centrifugación en frío a 2000 rpm durante 10 minutos. Luego se realizan 2 lavados con agua estéril fría y un lavado con 5 ml de AcLiTE (0,1 M acetato de litio, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5), después las células se resuspenden en 0,4 ó 0,2 ml de AcLiTE, dependiendo si provienen de medio YPD o SD, respectivamente y se incuban en agitación a 30 °C durante 15 minutos. Finalmente se añade 1/10 del volumen total de ssDNA (10 mg/ml) y se divide en alícuotas de 55 μ l si las células competentes se usan inmediatamente; en caso contrario, se añade 1/4 del volumen total de glicerol 80% (v/v), se divide en alícuotas de 75 μ l y se guardan a -80 °C.

3.6.2 Transformación por choque térmico

Se agrega el plásmido a transformar a las células competentes junto con 270 µl de PEG 4000 al 45% (v/v) y 30 µl de AcLiTE 10X, esta mezcla se agita vigorosamente usando un vórtex y se incuba 30 minutos a 30 °C. Luego se vuelve a agitar en un vórtex, se incuba 20 minutos a 42 °C y se centrifuga durante 5-10 segundos a máxima velocidad. Las células se resuspenden en 100 µl de sorbitol 1M y se extienden en una placa de SCD.

3.7 Búsqueda y análisis de mutantes

3.7.1 Rastreo de líneas de *A. thaliana*

La población S₀ de líneas mutantes fue analizado mediante un rastreo primario de alta densidad (aproximadamente 1000 semillas por placa de 9 cm de Ø) en medio MS sólido suplementado con 3,2 mM de noespermidina. Las semillas esterilizadas fueron puestas en una solución de agarosa 0,1% (p/v) y se distribuyeron manualmente en la placa usando un asa de plástico estéril; las placas fueron selladas con cinta porosa y se incubaron según las condiciones ya mencionadas.

Las plántulas que presentaban emergencia de raíz y ambos cotiledones verdes y expandidos fueron consideradas resistentes, estas plántulas S₁ fueron transferidas del medio con noespermidina a un medio MS sin noespermidina durante unos días para permitir el mayor desarrollo de la raíz y posteriormente fueron transplantadas a tierra para obtener la siguiente generación (Figura 3.8)

La generación S₂ fue analizada mediante un rastreo secundario con baja densidad de semillas (100 semillas por placa de 9 cm de Ø) en medio MS sólido suplementado con 2,8 mM de noespermidina. Este rastreo secundario se realizó para confirmar el fenotipo de resistencia a noespermidina observado en el rastreo primario.

3.7.2 Comprobación de la presencia de T-DNA

Se extrajo DNA genómico de 3 plántulas S₂ de cada mutante crecidas en medio MS líquido durante 12 días. El DNA extraído se digirió con la enzima de restricción *BamHI*. Posteriormente se realizó un análisis “Southern Blot” empleando una sonda 35S (identifica el extremo derecho del T-DNA) y una sonda BAR (identifica el extremo izquierdo del T-DNA); estas sondas fueron obtenidas por PCR al amplificar el activador transcripcional 35S y el gen

BAR, que posee el T-DNA (Figura 3.1), con la pareja de cebadores 5'35S / 3'35S y 3'BAR / 5'BAR (Anexo 1).

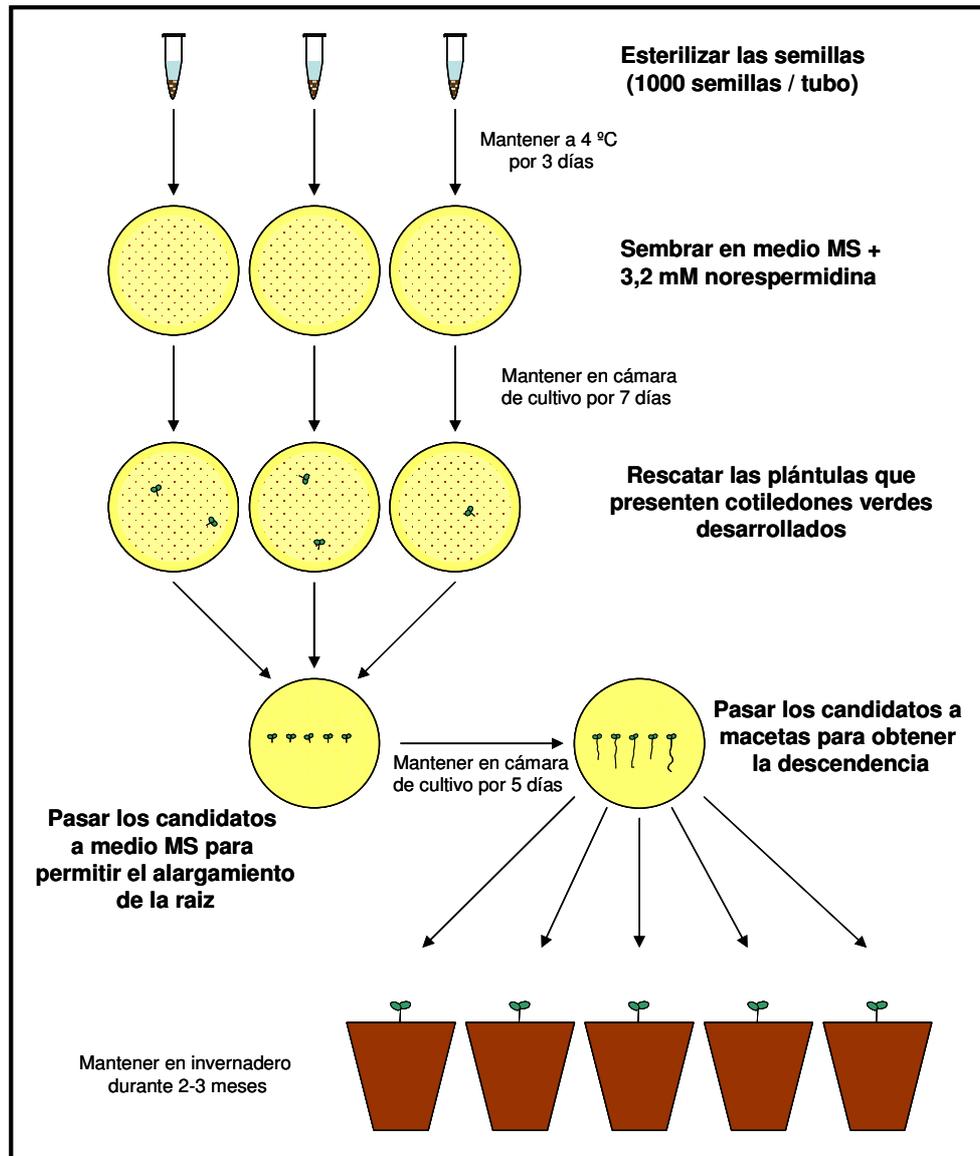


Figura 3.8 Esquema para la obtención de mutantes resistentes a noespermidina

3.7.3 Análisis genético

La línea mutante se cruzó con el ecotipo silvestre *Columbia* (*Col-7*) mediante la polinización manual de flores emasculadas (Bent, 2000). Para determinar si la mutación es dominante o recesiva, las semillas F_1 del cruce fueron puestas en tierra para obtener la generación F_2 por autopolinización y se determinó el porcentaje de plántulas con cotiledones verdes y expandidos a los 5 días en placas con medio MS sólido suplementadas con 2.8 mM de noespermidina.

3.7.4 Análisis de cosegregación

Este análisis permite conocer si existe correlación entre el fenotipo de resistencia a noespermidina y el T-DNA presente en el genoma. Para ello se sembraron semillas de la población F₂, del cruce entre el mutante y el ecotipo silvestre, en medio MS sólido suplementado con 2,8 mM de noespermidina y a los 5 días se seleccionaron las plántulas que presentaban el fenotipo de resistencia a noespermidina (emergencia de raíz y ambos cotiledones verdes y expandidos). Estas plántulas fueron pasadas a medio MS líquido y se dejaron crecer durante 12 días. Se extrajo el DNA genómico de cada plántula y se realizó un análisis “Southern Blot” para determinar la presencia o ausencia de inserciones de T-DNA empleando una sonda 35S específica del T-DNA. Paralelamente se realizó un análisis de PCR de cada individuo utilizando los cebadores F30 y 5’LB (Anexo 1)

3.7.5 Rescate plasmídico

Esta técnica se empleó para determinar el punto de inserción del T-DNA en el genoma de la planta mutante. Consiste en digerir el DNA genómico del mutante con una enzima de restricción y circularizar todos los fragmentos, siendo únicamente capaz de transformar *E. coli* el DNA circularizado que presente el plásmido pBstKS+, incluido en el T-DNA (Figura 3.1). Este DNA circularizado contiene la región genómica flanqueante a la inserción del T-DNA que se secuencía utilizando cebadores específicos del T-DNA.

2 µg de DNA genómico de la planta mutante son digeridos con una de las enzimas de restricción *EcoR* I ó *BamH* I a 37 °C durante 2 horas; se agrega un volumen de PCI (fenol:cloroformo:alcohol isoamilico 25:24:1) y el DNA (presente en la fase acuosa) se precipita con dos volúmenes de EtAcNA (1 ml AcNa 3 M en 19 ml de etanol absoluto) a -20 °C durante 24 horas. Luego el DNA se resuspende en 88 µl de agua estéril y se recirculariza agregando 2µl de la enzima ligasa T4 (5 U/µl), 10 µl de tampón de ligación e incubando a 14 °C durante toda la noche. Seguidamente el DNA se precipita de nuevo con dos volúmenes de EtAcNA a -20 °C durante 5 horas, después el precipitado se lava con etanol 70% (v/v) y se resuspende en 10 µl de agua estéril.

Para transformar *E. coli* se usa la cepa XL1-Blue MRF’ y se emplean 5 µl de DNA circularizado. Las condiciones de la electroporación están descritas en el apartado 3.4.2. Finalmente los plásmidos aislados son secuenciados usando los cebadores 5’LB en el caso del DNA genómico digerido con *BamH* I y 5’Eco para el DNA digerido con *EcoR* I (Anexo 1).

3.8 Ensayo de aparición de cotiledones

Los medios y condiciones de cultivo se describen en los apartados 3.2.1 y 3.3. Se colocaron en medio sólido 50 semillas de cada línea a analizar y el porcentaje de plántulas con cotiledones verdes expandidos fue determinado al cabo de 6 días. Se realizaron al menos 3 repeticiones de cada tratamiento. Para la toma de fotos individuales a las plántulas se utilizó el microscopio estereoscópico SMZ800 (Nikon).

3.9 Ensayos de crecimiento en invernadero

Se realizaron 2 tipos de ensayo de estrés en condiciones de invernadero. El primer ensayo consistió en colocar 10-15 semillas por maceta y empezar a regarlas desde el primer día con solución nutritiva suplementada con NaCl o LiCl a las concentraciones indicadas en cada experimento. Un segundo ensayo consistió en transplantar cinco plántulas de 6 días, crecidas en medio MS sólido a macetas y regarlas con agua hasta que se haya desarrollado completamente la roseta y aparezca la inflorescencia primaria, a partir de este momento se empieza a regar con solución nutritiva suplementada con NaCl o LiCl a las concentraciones indicadas en cada experimento.

3.10 Ensayos de peso fresco

Para determinar el peso fresco de las plántulas en diferentes medios, se colocaron en medio sólido 50 semillas de cada línea a analizar y al cabo de 6 días se recogieron todas las plántulas y semillas y se pesaron en una balanza electrónica (Precisa).

Para determinar el peso fresco de la parte aérea en plantas sometidas a estrés, plantas adultas fueron regadas con solución nutritiva suplementada con NaCl o LiCl durante 14 y 6 días respectivamente. Posteriormente las plantas fueron cortadas por debajo de la roseta y pesadas en una balanza electrónica (Sartorius).

3.11 Ensayo de toma y acumulación de cationes y norespermidina

3.11.1 Potasio, sodio, litio y norespermidina

Para el ensayo de toma de Na⁺, Li⁺ y norespermidina en plántulas de *Arabidopsis* primero se sembraron semillas en medio MS sólido, después de 5 días se pasaron 3 plántulas a medio MS líquido donde se mantuvieron por 10 días para finalmente traspasar las plántulas

a un nuevo medio MS líquido suplementado con NaCl, LiCl o norespermidina. Para cada intervalo de tiempo se tomaron 3 plantas de cada línea, las cuales se lavaban 2 veces en una solución fría de 20 mM de MgCl₂ y 2 veces en agua estéril fría. Finalmente se guardaron las muestras en papel filtro y se dejaron secando en una estufa a 50 °C durante 2-3 días cuando se iba a medir el contenido de Na⁺ o Li⁺. Para medir el contenido de norespermidina, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C.

Para el ensayo de acumulación de Na⁺, Li⁺, K⁺ y norespermidina en plántulas, se repitió el procedimiento anterior, pero las plántulas se dejaron en medio MS líquido suplementado con NaCl, LiCl o norespermidina durante 2 días. En el caso del K⁺, se cogieron las muestras después de 12 días en medio MS líquido.

Para el ensayo de acumulación de Na⁺, Li⁺ y K⁺ en la parte aérea de plantas adultas se usaron plantas crecidas en invernadero (4-5 semanas) que tenían la inflorescencia primaria desarrollada y que fueron regadas con solución nutritiva suplementada con NaCl o LiCl durante 5 y 3 días, respectivamente. Finalmente se cortó la planta debajo de la roseta y se colocó en una estufa a 50 °C durante 2-3 días.

Para el ensayo de acumulación de Na⁺, Li⁺ y K⁺ en la raíz de plantas adultas se usaron plantas crecidas en un sistema hidropónico (4-5 semanas) que tenían la inflorescencia primaria desarrollada, estas plantas fueron regadas con solución nutritiva suplementada con NaCl o LiCl durante 2 días. Se cortó la raíz debajo de la roseta y se colocó en una estufa a 50 °C durante 2 días.

3.11.2 Rubidio

El rubidio se usa en fisiología como análogo del potasio. Para el ensayo de toma de Rb⁺ en plántulas de *Arabidopsis*, primero se sembraron semillas en medio MS sólido y después de 5 días se pasaron 3 plántulas a medio MS líquido donde se mantuvieron por 10 días. Después se lavaron las plántulas 2 veces con agua estéril y se pasaron a un medio MS líquido sin K⁺ y suplementado con 1 mM de RbCl. Para cada intervalo de tiempo se tomaron 3 plantas de cada línea, las cuales se lavaron 2 veces en una solución fría de 20 mM de MgCl₂ y 2 veces en agua estéril fría. Finalmente se guardaron las muestras en papel filtro y se colocaron en una estufa a 50 °C durante 2-3 días.

3.12 Ensayo de acumulación de iones en el xilema

Se partió de plantas crecidas en invernadero (4-5 semanas) con la inflorescencia primaria desarrollada que fueron regadas con solución nutritiva suplementada con NaCl ó LiCl durante 3 y 2 días respectivamente. Con una cuchilla se cortó la inflorescencia por la base y se colocó en una cámara de presión de Scholander (PMS Instrument) a una presión de 10 a 50 bar. Las primeras gotas de líquido xilemático fueron descartadas para evitar contaminación por fluido floemático. Se tomó el líquido xilemático usando una micropipeta.

3.13 Medida de cationes y norespermidina

3.13.1 Cationes

Una vez las muestras eran secadas en la estufa, se trituraron y se colocaron 10 mg en un tubo donde se añadió 1 ml HNO₃ 0,1 M y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se centrifugó 2 minutos, el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se guardó a 4 °C. Para determinar la cantidad de Rb⁺, Li⁺, Na⁺ y K⁺ se empleó un espectrofotómetro de absorción atómica SpectrAA 10plus (Varian).

3.13.2 Norespermidina

Las muestras se trituraron en un mortero usando nitrógeno líquido, se colocaron 200 mg de tejido en un tubo de centrifuga y se añadió 2 ml de ácido perclórico 5% (v/v) frío. Se incubó en hielo 1 hora y se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante, conteniendo la fracción de poliaminas se guardó a -20 °C.

La benzoilación de las poliaminas se realizó según Flores y Galston (1982). 0,5 ml de extracto de poliaminas fue colocado en un tubo de vidrio, se añadió 1 ml de NaOH 2 M y 15 µl de cloruro de benzoilo, se mezcló vigorosamente usando vórtex durante 1 minuto, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se agregaron 2 ml NaCl 5 M. Después se añadieron 2 ml de éter dietílico y se mezcló en vórtex durante 1 minuto, cogiendo luego la fase superior, donde se encuentran las poliaminas benzoiladas, y colocándola en un tubo de vidrio. Finalmente se repitió el proceso con 1 ml de éter dietílico y se eliminó el éter usando un sistema de secado por aire. Las poliaminas benzoiladas fueron resuspendidas en 200 µl de metanol. Los patrones de norespermidina (10 y 20 nmoles de norespermidina) fueron tratados de forma similar.

La cantidad de noespermidina benzoilada fue determinada usando un sistema de HPLC compuesto por una bomba Waters 600E, un Autosampler Waters 717plus, un detector de absorbancia Waters 486 y una columna Symetry C₁₈ 5 μm (Waters). La longitud de onda a la cual se detectó el grupo benzoilo unido a un grupo amino de la noespermidina (noespermidina benzoilada) fue 254 nm y una AUFS de 2. Los datos se procesaron usando el programa Millennium32 suministrado por Waters. La fase eluyente estaba compuesta por un gradiente agua:metanol (50:50) a un flujo constante de 1 ml/minuto hasta una proporción 30:70. Después de analizar cada muestra, se lavó la columna con metanol puro durante 20 minutos seguido de 15 minutos con agua metanol (50:50) para volver a equilibrar la columna.

3.14 Medida del potencial de membrana

Las medidas de potencial de membrana fueron llevadas a cabo en el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga por la Dra. María Jesús García Sánchez según el siguiente protocolo. Las semillas se germinaron esterilizándolas con lejía al 10% (v/v) durante 10 minutos, seguido de cinco lavados de 5 minutos con agua estéril. Las semillas se resuspendieron en agarosa al 0,15% (p/v) y se sembraron en placas Petri de 15 cm Ø sobre papel de filtro embebido en 7 ml de medio MS diluido al 25%. Las placas se mantuvieron 24 horas en oscuridad a 4 °C, y luego se pasaron a una cámara de cultivo mantenida a 25 °C con un fotoperiodo 16:8, con una intensidad de luz de 50 μmol m⁻² s⁻¹.

El potencial de membrana (E_m) se mide utilizando la técnica estándar de medida con microelectrodos de vidrio descrita por Felle (1981). Las raíces procedentes de plantas de entre 15 y 20 días de cultivo se montan sobre cámaras de Plexiglass de aproximadamente 1,1 ml de volumen, manteniéndose un flujo continuo de medio de ensayo (1 mM KCl, 1 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM Mes-Tris pH 5.5) de aproximadamente 10 ml/min. Los electrodos se introducen en las células epidérmicas o en las células corticales más externas de la zona de los pelos radiculares. Los microelectrodos se rellenan con 500 mM de KCl y se encajan en portaelectrodos que contienen un depósito de Ag/AgCl, y que se conectan a un voltímetro de alta impedancia FD-223 (World Precisión Instruments).

3.15 Purificación y análisis de ácidos nucleicos

3.15.1 Aislamiento de DNA plasmídico

Escherichia coli

Se empleó el método descrito por Holmes y Quigley (1981). Las células de 2 ml de cultivo crecidas en medio LB con el antibiótico selectivo se recogen por centrifugación y se resuspenden en 0,5 ml de STET (10% p/v sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA y 1% v/v Triton X-100), se añaden 5 µl de lisozima 5% (p/v) y se calienta a 95 °C durante 2 minutos para lisar las células. Se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos y se elimina el sedimento (restos celulares y DNA cromosómico). Al sobrenadante se le agregan 400 µl de isopropanol y se deja a -20 °C durante 15 minutos. Se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos y se resuspende el precipitado en 200 µl de agua estéril, se añaden 700 µl de etanol absoluto:acetato de amonio (6:1) y se deja a -20 °C durante 20 minutos. Se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos y se lava el precipitado con etanol 70% (v/v). Finalmente se deja secar el precipitado para eliminar el etanol y se resuspende en agua estéril.

Cuando los plásmidos aislados eran enviados a secuenciar, se realizaba un tratamiento con RNAasa y PCI. Se agregan agua estéril hasta un volumen final de 100 µl, 1,5 µl RNAasa 1% (p/v) y se incuba a 37 °C durante 40 minutos. Se agregan 100 µl de PCI, se mezcla y se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos. Después se toma la fase acuosa superior, se coloca en un tubo nuevo, se añade el doble de volumen de EtAcNa (para precipitar el DNA) y se incuba a -20 °C durante toda la noche. Finalmente se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos, se lava el precipitado con etanol 70%, se deja secar el precipitado para eliminar el etanol y se resuspende en agua estéril.

Agrobacterium tumefaciens

Las células de 2 ml de cultivo saturado crecido en medio LB con el kanamicina se recogen por centrifugación y se resuspenden en 100 µl de tampón de lisis frío (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA y 0,4% p/v lisozima), se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y 5 minutos en hielo. Después se añaden 200 µl de solución de lisis (0,2 M NaOH y 1% p/v SDS), se mezcla suavemente por inversión del tubo y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego la mezcla de lisis se neutraliza con 150 µl de acetato de potasio 3 M pH 4,8, se mezcla por inversión del tubo y se incuba en

hielo durante 10 minutos. Se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos, para precipitar los restos celulares, el sobrenadante se pasa a un tubo nuevo donde se añade un volumen igual de PCI, se mezcla con vórtex y se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos. Finalmente se toma la fase acuosa superior, se pasa a un tubo nuevo y se agrega 1 ml de etanol absoluto frío, para precipitar el DNA plasmídico, se centrifuga a máxima velocidad, el precipitado se lava con etanol 70% se deja secar para eliminar el etanol y se resuspende en agua estéril.

3.15.2 Aislamiento de DNA genómico de *Arabidopsis*

Se empleó una adaptación del método del CTAB descrita en McKinney (1995). Aproximadamente un gramo de tejido vegetal es homogenizado en mortero usando nitrógeno líquido. Este homogenizado se coloca en un tubo falcon, se le añaden 2 ml de tampón de extracción CTAB (2% p/v CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl y 1% p/v PVP Mr 40000) y se incuba a 60 °C durante 15 minutos. Después se agregan 2 ml de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), se mezcla usando vórtex y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. Se toma la fase acuosa superior y se añaden 0,1 volúmenes de la solución CTAB 10X (10% p/v CTAB y 0,7 mM NaCl), se calienta a 60 °C durante 2 minutos y se añaden dos volúmenes de agua estéril fría para inducir la precipitación del complejo CTAB/DNA-RNA, se incuba en hielo durante 3 horas y se recoge el precipitado mediante centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en 0,4 ml de NaCl 1M, se añaden 0,8 ml de etanol absoluto frío para inducir la precipitación del DNA y se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, el DNA precipitado se lava dos veces con etanol 70% para quitar el exceso de sal y el precipitado final se resuspende en agua estéril.

3.15.3 Electroforesis de DNA

Para comprobar la integridad y concentración del DNA plasmídico y genómico extraído se emplearon geles de agarosa 0,8% (p/v) fundida en tampón de electroforesis TBE 0,5X (45 mM TrisBase, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA). Tanto el tampón de electroforesis como el gel contenían 0,05% (p/v) de bromuro de etidio. La visualización del DNA se realizó iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda.

Para la purificación de fragmentos de DNA se usaron geles de agarosa 1% (p/v) fundida en tampón de electroforesis TAE 1X (40 mM TrisBase, 20 mM ácido acético y 2 mM

EDTA). El gel y el tampón de electroforesis contenían 0,005% (v/v) de bromuro de etidio. La visualización del DNA se realizó iluminando el gel con luz UV a 366 nm de longitud de onda, con ello se pretendió minimizar la rotura de la cadena de DNA del fragmento a purificar. Para extraer y purificar el fragmento de DNA se usó el kit “*Rapid Gel Extraction System*” (Marligen)

Como tampones de carga se utilizaron:

- Tampón 6X naranja (50% v/v glicerol, 60 mM Tris-HCl pH 8, 6 mM EDTA y 0,35% p/v Orange G)
- Tampón 6X azul (40% p/v sacarosa, 0,1 M EDTA y 0,25% p/v azul de bromofenol)

Como marcadores de tamaño y peso molecular se utilizaron los patrones comerciales 1Kb y λ Hind III de Invitrogen.

3.15.4 Análisis “Southern Blot”

1 μ g de DNA se digiere con la enzima de restricción *BamHI* durante 2-3 horas. La separación de los fragmentos de restricción se realiza en un gel TAE 1X a un voltaje de 15-25 V durante toda la noche. El DNA se desnaturaliza usando una solución de NaOH 0,4 M y se transfiere a una membrana Hybond N⁺ (Amersham) mediante la técnica de transferencia de DNA en medio alcalino, descrita en Sambrook y Russell (2000), durante toda la noche. Finalmente el DNA se fija covalentemente a la membrana por radiación ultravioleta usando un aparato Stratalinker (Stratagene).

La membrana con el DNA fijado se coloca en un tubo de hibridación ThermoHybaid (Thermo), se añaden 5 ml de tampón de hibridación PSE (0,4 M Na₂HPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA y 7% p/v SDS) y se deja durante 20 minutos en un horno con agitación circular a 65 °C. Después se agrega una sonda radioactiva, para detectar el DNA en la membrana, al tampón de hibridación y se deja durante 16-18 horas a 65 °C en agitación. Posteriormente se realizan 2 lavados de la membrana, para eliminar la sonda no unida específicamente, de 20 minutos a 65 °C con un tampón de lavado (40 mM Na₂HPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA y 5% p/v SDS). Después la membrana es secada a temperatura ambiente y envuelta en plástico Saran Wrap. Finalmente la membrana se expone con una película Hyperfilm (Amersham) a -80 °C en un casete de revelado Hypercassette (Amersham) con pantallas intensificadoras. Las películas son reveladas en una procesadora automática M35X-Omat (Kodak).

3.15.5 Aislamiento de RNA de *Arabidopsis*

El material vegetal para la extracción de RNA estaba compuesto por hojas de roseta de plantas de *Arabidopsis* crecidas en invernadero. Cuando se realizó el análisis de expresión en diferentes órganos de la planta, el material vegetal provino de plantas adultas, excepto en el caso de raíz que provino de plantas crecidas en medio MS sólido en posición vertical. En el análisis de expresión a diferentes tratamientos de estrés se emplearon plántulas crecidas en medio MS líquido durante 10 días a las que se aplicó el estrés correspondiente durante el tiempo indicado. Acabado el tratamiento, el material vegetal se lavó dos veces en agua estéril y se congeló en nitrógeno líquido.

El protocolo de extracción de RNA fue el mismo para todo tipo de material vegetal. Un gramo de material congelado se homogeniza en mortero, se coloca en un tubo falcon, se agrega 1 ml de PCI y 1 ml de TCES (0,2 M Tris, 0,2 M NaCl, 50 mM EDTA, 2% p/v SDS, ajustado a pH 8 con HCl) y se incuba a 50 °C durante 15 minutos. A continuación se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos, se toma la fase superior acuosa y se coloca en un nuevo tubo donde se añade un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcla en vórtex y se vuelve a centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos. Luego se pasa la fase superior a un tubo nuevo y el RNA se precipita agregando un volumen de LiCl 6 M y colocándolo a -20 °C durante 4-5 horas. Finalmente se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos, el precipitado se lava con etanol 70% y se resuspende en agua estéril. Para comprobar la integridad del RNA se emplean geles no desnaturizantes y para conocer la concentración se utiliza un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop)

3.15.6 Electroforesis de RNA

Condiciones desnaturizantes

Estos geles se emplearon para realizar el análisis “Northern Blot”. Se preparan geles de agarosa 1% en tampón MAE 1X (10% v/v MAE 10X [200 mM MOPS, 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA y ajustado a pH 7 con NaOH] y 2,2% v/v formaldehído 37%). Como tampón de electroforesis se emplea 10% (v/v) MAE 10X y 1,1% (v/v) formaldehído 37%. Las muestras de RNA se mezclan con el tampón de carga 1,25X (55% v/v formamida, 20% v/v formaldehído, 12,5% v/v MAE 10X, 8% v/v glicerol, 0,05% p/v azul de bromofenol y 0,001% p/v de bromuro de etidio) y se calientan a 56 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en el gel. Se uso el “*RNA ladder*” (Invitrogen) como marcador de tamaño.

Condiciones no desnaturalizantes

Estos geles se emplearon para observar la integridad del RNA total aislado. Se preparan geles de agarosa 1% TAE 1X, las muestras se cargan con el tampón 1,25X y se calientan a 56 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en el gel.

3.15.7 Análisis “Northern Blot”

Se emplearon 15-25 µg de RNA que se separa, según el tamaño, en geles desnaturalizantes usando un voltaje de 80-100 V durante 3-4 horas. El gel se lava 2 veces con una solución de SSC 10X (1,5 M NaCl, 0,15 M citrato sódico, ajustado a pH 7 con HCl) durante 20 minutos cada lavado, así se elimina el formaldehído del gel. El RNA se transfiere a una membrana Hybond N (Amersham) por capilaridad en tampón SSC 10X durante toda la noche. Finalmente el RNA se fija covalentemente a la membrana por radiación ultravioleta usando un aparato Stratalinker (Stratagene).

La membrana con el RNA fijado se coloca en un tubo de hibridación ThermoHybaid (Thermo), se añaden 5 ml de tampón de hibridación PSE y se deja durante 20 minutos en un horno con agitación circular a 65 °C. Después se agrega una sonda radioactiva, para detectar el RNA en la membrana, al tampón de hibridación y se deja durante 16-18 horas a 65 °C en agitación. Posteriormente se realizan dos lavados de la membrana de 5 minutos a 65 °C con una solución SSC 4X, 0,1% (p/v) SDS y un lavado con la solución SSC 0,4X, 0,1% (p/v) SDS. Después la membrana es secada a temperatura ambiente y envuelta en plástico tipo “Saran Wrap”. Finalmente se realiza la autoradiografía del mismo modo que en el análisis “Southern Blot”.

3.15.8 Marcaje radioactivo de sondas

El DNA empleado para la síntesis de sondas radioactivas en los experimentos de “Southern Blot” y “Northern Blot” fue obtenido mediante amplificación por PCR de DNA genómico. El producto de PCR es visualizado en un gel TAE 1X y purificado usando el kit “*Rapid Gel Extraction System*” (Marligen).

Para el marcaje radioactivo de las sondas se usó el método de marcaje por hexanucleótidos (“random priming”) descrito en Sambrook y Russell (2000). Como DNA molde se emplean 80-100 ng de DNA. El DNA molde se coloca en 15 µl de agua estéril y se desnaturaliza a 95 °C durante 10 minutos. Seguidamente se pone en hielo y se agregan 5 µl de

OLB 5X (0,1 M MES pH 6,8, 5 mM DTT, 25 mM MgCl₂, 100 µg hexanucleotidos al azar “hexanucleotides random primers” (Boehringer), 0,1 mM dATP, 0,1 mM dGTP, 0,1 mM dTTP), 1 µl del fragmento klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* (10 U/µl), 2,5 µl de BSA 10X (albúmina de suero bovino) para estabilizar la enzima y 2 µl de α-³²P dCTP (10 µCi/µl) como nucleótido radioactivo. Finalmente se incubó a temperatura ambiente durante 8-10 horas y se añaden 200 µl de TE 1X (1mM EDTA, 10 mM Tris pH 8) para detener la reacción, se desnaturaliza el DNA nuevamente y se añade al tubo de hibridación que contiene la membrana a hibridar.

3.16 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.16.1 Oligonucleótidos cebadores

Todos los cebadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados por la empresa Isogen Life Science. En el anexo 1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones de PCR, PCR diagnóstica y RT-PCR cuantitativa.

3.16.2 Condiciones de PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de forma rutinaria en un volumen de 25 µl en tubos estériles, donde se añadieron los diferentes reactivos según el siguiente protocolo:

DNA molde	5-10 ng
Tampón PCR 10X	2,5 µl
dNTPs 2,5 mM	2,5 µl
Cebador sentido (0,1 µg/µl)	2,5 µl
Cebador antisentido (0,1 µg/µl)	2,5 µl
Polimerasa (<i>Taq</i> , TITANIUM <i>Taq</i>) 1U /µl	0,5-2 µl
H ₂ O MilliQ	volumen suficiente para 25 µl

Como polimerasa termoestable en las reacciones rutinarias donde no se requería una alta fidelidad se usó la enzima *Taq* (Biotools), mientras que cuando se requería una amplificación del DNA de alta fidelidad se empleó la enzima TITANIUM™ *Taq* (Clontech). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MINICYCLER™ PTC-150 (MJ Research) usando el siguiente programa de PCR:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 min.
- 25-30 ciclos de: desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación de los cebadores utilizando una temperatura de anillamiento de 2 a 3 °C inferior a la T_m de los oligonucleótidos durante 30 s, y una extensión a 72 °C de 1 min por kb a amplificar en el caso de la enzima *Taq* o una temperatura de 68 °C y 2 min por kb a amplificar en el caso de la enzima TITANIUM™ *Taq*.
- 1 ciclo de extensión final a 72 o 68 °C durante 5 min.

3.16.3 PCR diagnóstica

Para la obtención de líneas mutantes homocigotas de inserción de T-DNA, suministradas por el NASC, se realizaron PCR diagnósticas utilizando un par de oligonucleótidos (LP y RP), que hibridan en el DNA del genoma de *Arabidopsis*, localizados a cada lado del T-DNA y un tercer oligonucleótido que hibrida en el T-DNA (Lbb1). La información para la obtención de líneas homocigotas, así como el programa *T-DNA Primer Design* para el diseño de los oligonucleótidos LP y RP se pueden consultar en <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

3.16.4 RT-PCR cuantitativa

Se añaden 2 µg de RNA total en un volumen de 16 µl de agua estéril junto con 10 µl de dNTPs (2,5 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato) y 2 µl del cebador para RNA oligo p(dT)₁₅ (0,1 µg/µl) y se incuba a 65 °C durante 5 minutos para romper posibles estructuras secundarias de RNA y permitir el anillamiento del cebador.

La reacción de síntesis de cDNA se lleva a cabo en un volumen total de 40 µl, conteniendo los 28 µl de la mezcla anterior, 8 µl de buffer RT X5, 4 µl de DTT (0,1 M) y 0,7 µl de transcriptasa inversa M-MuLV (20 U/ µl). Se incuba a 37 °C durante 75 minutos, se inactiva la enzima calentando a 65 °C durante 5 minutos y se coloca el tubo inmediatamente en hielo. La mezcla de PCR se lleva a cabo según el siguiente protocolo:

cDNA molde	0,5 µl
Tampón PCR 10X	2 µl
dNTPs 2,5 mM	2 µl
Cebador sentido (0,1 µg/µl)	1 µl
Cebador antisentido (0,1 µg/µl)	1 µl

Polimerasa <i>Taq</i> 1U / μ l	0,5 μ l
EVAGREEN (Biotium Inc.) 20X	1 μ l
H ₂ O MilliQ	12 μ l

Las reacciones de PCR se realizaron en el sistema 7000 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) con el siguiente programa:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 min.
- 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación de los cebadores utilizando una temperatura de anillamiento de 2 a 3 °C inferior a la T_m de los oligonucleótidos durante 30 s, y una extensión a 72 °C de 30 s.
- 1 ciclo de disociación: desnaturalización a 95 °C durante 15 s, hibridación de los cebadores a 60 °C durante 20 s, y desnaturalización a 95 °C durante 15 s.

3.17 Construcción de plantas transgénicas

El cDNA conteniendo el marco abierto de lectura fue obtenido de *RIKEN BRC Experimental Plant Division* (<http://www.brc.riken.jp/lab/epd/Eng/>) y corresponde al clon RAFL07-14-M12. Este cDNA fue subclonado en el sitio *Not* I del plásmido pBlueScripSK(+) obteniendo la construcción pBSQSO2. Para la transformación de plantas silvestres se procedió a subclonar el fragmento *Xba* I - *Sac* I de la construcción pBSQSO2 en el plásmido pBI121 (pBI121QSO2), esta construcción se transformó en una cepa GV3101 C58C1 de *A. tumefaciens*. Para transformar plantas del mutante *skor1-2* y *akt1-1*, se subclonó el fragmento *Hind* III - *Eco*R I de la construcción pBI121QSO2 en el plásmido pCAMBIA1300 y se transformó en una cepa GV3101 C58C1 de *A. tumefaciens*.

3.17.1 Transformación de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens*

Se emplearon 5-8 plantas de *A. thaliana* crecidas en tierra con una inflorescencia primaria de alrededor de 10 cm de longitud. A estas plantas se les cortó el ápice de la inflorescencia primaria para promover la aparición de inflorescencias secundarias y tener mayor cantidad de capullos florales. La transformación de las plantas se realizó 4-5 días después de haber cortado el ápice de la inflorescencia primaria.

Para la transformación se agrega 1 ml de cultivo saturado de *A. tumefaciens* con el vector a 200 ml de medio LB con kanamicina (50 μ g/ml) y se incuba en agitación a 28 °C durante 24 horas. Luego las células son recogidas por centrifugación en frío a 4000 rpm

durante 10 minutos y resuspendidas en 400 ml de solución de transformación compuesta por 5% (p/v) sacarosa y 0,02% (v/v) detergente Silwet L-77 (Lehle Seeds).

La solución de transformación se coloca en un recipiente donde se introduce la parte aérea de las plantas durante 10-15 segundos. Luego se cubren las plantas con bolsas de plástico para mantener la humedad y aumentar la eficiencia de la transformación. Después de 2 días se retiran las bolsas y se mantienen las macetas en el invernadero hasta recoger la población de semillas transgénicas T₁.

3.17.2 Selección de líneas transgénicas

Las semillas transgénicas T₁ se siembran en placas Petri de 14 cm Ø con medio MS suplementado con el antibiótico de selección de plantas transgénicas. Después de 8-10 días, las plántulas resistentes al antibiótico (T₁) son rescatadas y transplantadas a macetas para obtener la generación T₂. Las semillas T₂ son crecidas en medio MS sólido con el antibiótico de selección para observar la segregación de la resistencia al antibiótico. De aquellas líneas transgénicas cuyas semillas muestran una segregación 3:1 (resistentes:sensibles) para el antibiótico, se pasan las plántulas resistentes a tierra para obtener la generación T₃. La segregación 3:1 es la que se espera cuando existe una sola integración del T-DNA en el genoma. Las semillas T₃ se sembraron en medio MS sólido con el antibiótico de selección para identificar los individuos homocigotas.

3.18 Transformación transitoria de *N. benthamiana* mediada por *A. tumefaciens*

El cDNA del gen *QSO2* ubicado en el plásmido pBSQSO2 fue amplificado mediante PCR para clonarlo en el sitio *Xba* I - *Bam*H I de la construcción pSKsGFPnos (Chiu *et al.*, 1996) y situarlo en fase con la secuencia que codifica para la proteína GFP, obteniendo la construcción pSKQSO2-GFPnos. Posteriormente, el fragmento *Xba* I - *Eco*R I de esta construcción se subclonó en el plásmido pBI121 y esta nueva construcción se transformó en la cepa GV3101 C58C1 de *A. tumefaciens*.

Para obtener una mayor cantidad y evitar un silenciamiento post-transcripcional de la proteína QSO2, el plásmido pIC6692 (Voinnet *et al.*, 2003) se cotransformó junto con el plásmido pBI121QSO2-GFPnos en hojas de *N. benthamiana*. El plásmido pIC6692 lleva el gen del supresor del silenciamiento génico p19 del virus del enanismo modificado del tomate (TBSV) bajo el control del promotor 35S.

Se emplearon plantas de *N. benthamiana* crecidas en tierra durante 4-5 semanas y se transformaron según Orzaez *et al.*, 2006 con algunas variaciones. Primero se generan dos cultivos saturados de *A. tumefaciens*, uno con el vector pBI121QSO2-GFPnos y otro con el vector pIC6692. Luego 100 µl de cada cultivo saturado se emplea para inocular 10 ml de medio LB con el antibiótico de selección kanamicina (50 µg/ml) y se incuba en agitación a 28 °C durante 24 horas. Finalmente las células son recogidas por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos y ambos cultivos son resuspendidos en 10 ml de una solución compuesta por 10 mM MES pH 6, 10 mM MgCl₂ y 0,2 mM acetosiringona. La solución con las células resuspendidas se mantiene a temperatura ambiente durante 3 horas sin agitación, luego se coloca en una jeringa de 20 ml y se infiltra por capilaridad inyectando la solución en el envés de las hojas. Después de 3-5 días se corta un trozo de hoja y la fluorescencia de la proteína GFP se observa usando un microscopio confocal Leica DM IRE2 y un sistema de escáner confocal TCS-SL. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm y la longitud de onda de emisión fue de 510 nm. Para plasmolizar las células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana*, un trozo de hoja se sumerge en una solución de manitol 1 M durante 1 hora.

3.19 Ensayo de coexpresión en *S. cerevisiae*

El cDNA del gen *QSO2* ubicado en el plásmido pBSQSO2 fue digerido con las enzimas *Sac* I y *Sma* I y se crearon extremos romos, posteriormente se insertó en el sitio único *Xho* I del plásmido pRS421. El cDNA del gen *AKT1* ubicado en el plásmido pBS-AKT1, cedido por el grupo de Sentenac (INRA, Montpellier), fue clonado en el sitio *Xba* I - *Sac* I del plásmido pCAMBIA1300 para posteriormente ser subclonado en el sitio *Xba* I - *EcoR* I del plásmido pYPGE15. Ambas construcciones se cotransformaron y transformaron por separado en la cepa PLY232 como control silvestre y la cepa PLY240 con la mutación *trk1,2*. Para los ensayos de goteo se utilizaron cultivos de células en medio SD incubados durante 48 horas a 28 °C. Los fenotipos se observaron en medio YPD suplementado con diferentes cationes tóxicos empleando 3 diluciones: 1/10, 1/100 y 1/1000.

3.20 Preparación y análisis de proteínas

3.20.1 Preparación de extracto crudo de proteínas de *A. thaliana*

Se pesan 0,5 g de tejido vegetal y se homogeniza la muestra en un mortero, el tejido se coloca en un tubo de 1,5 ml, se añaden 0,1 ml de tampón de extracción (250 mM Tris-HCl pH 8, 0,5 M KCl, 25 mM EDTA, 5 mM DTT, 30% p/v sacarosa y una pastilla de inhibidores de

proteasas, *Complete Mini EDTA-free* (Roche) por cada 10 ml de tampón) y 0,5 ml de GTED 20 (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 20% v/v glicerol), se mezcla en vórtex y se centrifuga en frío a 2000 rpm durante 10 minutos para eliminar el debris. Luego se toma la fase superior y se centrifuga en frío a máxima velocidad durante 20 minutos, se elimina el sobrenadante que representa la **fracción soluble de proteínas** (proteínas citoplasmáticas y periplasmáticas) y se disuelve el precipitado en 0,2 ml de GTED 20 usando un homogenizador; esto representa la **fracción insoluble de proteínas** (proteínas asociadas a membranas y endomembranas). La cantidad de proteínas se cuantifica utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976, Kruger, 1994). Las muestras se mezclan con el tampón de carga LSB 5X (7,5%p/v SDS, 0,1 M DTE, 10 mM EDTA, 30% p/v sacarosa, 0,25 mg/ml azul de bromofenol, 0,3 M Tris-HCl pH 6,8) en la proporción 1:1 y las fracciones se almacenan a -20 °C.

3.20.2 Preparación de extractos de proteínas soluble e insoluble de *S. cerevisiae*

Se inoculan 50 µl de un cultivo saturado en 50 ml de medio SD y se incuba en agitación a 28 °C hasta que el cultivo alcance la fase exponencial ($A_{660} \approx 0,4$), posteriormente las células son recogidas por centrifugación en frío a 2000 rpm durante 4 minutos y lavadas una vez con agua estéril en un tubo de 1,5 ml. Las células se resuspenden en 300 µl de tampón de fraccionamiento (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 M KCl, 10% p/v sacarosa y una pastilla de inhibidores de proteasas, *Complete Mini EDTA-free* (Roche) por cada 10 ml de tampón) y se añaden bolas de cristal de 0,5 mm Ø, justo por debajo de la superficie de resuspensión, para romper las células mediante 3 ciclos de vórtex de un minuto y un minuto de incubación en hielo. Luego se agregan 200 µl de tampón de fraccionamiento y se centrifuga en frío a 2000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se centrifuga en frío a 13000 rpm durante 30 minutos. Finalmente el sobrenadante se coloca en un tubo nuevo y constituye la **fracción soluble de proteínas** (proteínas citoplasmáticas y periplasmáticas), el precipitado se disuelve en 200 µl de tampón de fraccionamiento usando un homogenizador, y constituye la **fracción insoluble de proteínas** (proteínas asociadas a membranas y endomembranas). La cantidad de proteínas se cuantifica utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976, Kruger, 1994). Las muestras se mezclan con el tampón de carga LSB 5X (7,5%p/v SDS, 0,1 M DTE, 10 mM EDTA, 30% p/v sacarosa, 0,25 mg/ml azul de bromofenol, 0,3 M Tris-HCl pH 6,8) en la proporción 1:1 y las fracciones se almacenan a -20 °C.

3.20.3 Preparación de extractos de proteínas extra e intracelular de *S. cerevisiae*

Se inoculan 20 μ l de un cultivo saturado de levadura en 50 ml de medio SD y se incuba en agitación a 28 °C hasta que el cultivo alcance una $A_{660} \approx 0,6$, luego las células son recogidas por centrifugación en frío a 2000 rpm durante 4 minutos y lavadas una vez con agua estéril. Posteriormente, las células se resuspenden en 3 ml de solución SoE (0,9 M sorbitol, 0,1 M EDTA pH 8 y una pastilla de inhibidores de proteasas, *Complete Mini EDTA-free* (Roche) por cada 10 ml de solución), se centrifuga en frío a 2000 rpm durante 4 minutos y las células se resuspenden en 450 μ l de SoE. Se colocan las células en un tubo de 1,5 ml, se agregan 35 μ l de DTE 0,5 M y 90 μ l de zimoliasa 100T (1 mg/ml) y se incuba a 37 °C en una rueda giratoria durante 40 minutos. Luego se centrifuga en frío a 2000 rpm durante 4 minutos y se recoge el sobrenadante que representa a las **proteínas extracelulares**, los protoplastos se resuspende en 0,5 ml de agua estéril y se rompen usando un homogenizador, finalmente se centrifuga en frío a 2000 rpm durante 4 minutos y se toma el sobrenadante que representa las **proteínas intracelulares** (proteínas de membranas y citoplasmáticas).

3.20.4 Preparación y purificación de proteína recombinante

La secuencia codificante del gen *QSO2* ubicado en el plásmido pBSQSO2 fue amplificado mediante PCR para clonarlo en el sitio *Mss* I del vector de expresión pCM262 (Gari *et al.*, 1997) y situarlo en fase con una secuencia que codifica 3 repeticiones del epítipo HA y 6 histidinas, obteniendo así la construcción pCM262QSO2. La proteína con las 6 histidinas es capaz de unirse y ser retenida por iones Ni^{2+} , lo que permite la purificación de la proteína recombinante a partir de extracto crudo en columnas con una resina previamente cargada con $NiSO_4$.

Para producir y purificar la proteína recombinante se transforma la cepa W303 de *S. cerevisiae* con el plásmido pCM262QSO2. Posteriormente se utiliza 0,3 ml cultivo saturado de levaduras, con el plásmido de expresión de la proteína recombinante, para inocular 300 ml de medio SD que se incuban a 28 °C hasta que el cultivo llega a una $A_{660} \approx 0,4$. La extracción de proteínas se realiza como se explica en el apartado 3.20.2 y la fracción soluble de proteínas se añade a un tubo de 1,5 ml donde se encuentra la resina de agarosa His-Bind (Novagen) previamente lavada y cargada como se explica en las instrucciones del fabricante. La fracción soluble y la resina de agarosa se incuban en agitación suave a 4°C durante una noche, la proteína recombinante con la cola de histidinas se une así a los iones de níquel inmovilizados

en la resina. Luego se realizan dos lavados de la resina con 1 ml de tampón de unión (5 mM imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8) y un lavado con 1 ml de tampón de lavado (40 mM imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8) en agitación suave durante 10 minutos cada uno a 4°C. El imidazol compite con las proteínas por la unión de los iones níquel de la columna y a estas concentraciones elimina las uniones inespecíficas de otras proteínas a la columna. Finalmente la proteína recombinante es purificada utilizando 1 ml de tampón de elución (300 mM imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8) en agitación suave durante 30 minutos a 4°C y eluyendo la proteína purificada en una columna. El aumento de la concentración de imidazol provoca que este sustituya a las histidinas de la proteína recombinante en la unión con los iones de níquel de la columna. La solución eluida se dializa contra una solución 20 mM Tris-HCl pH 8.

3.20.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE)

Las proteínas se separan en función de su tamaño utilizando un sistema de electroforesis vertical en mini-geles desnaturalizantes de poliacrilamida/SDS de 1,5 mm de grosor, utilizando el sistema de Laemmli para la compactación de las muestras (Laemmli, 1970). El gel consta de 2 partes: una superior, en la que se cargan las muestras, compuesta por 125 mM Tris, 0,1% (p/v) SDS, 3,4% (v/v) acrilamida-bisacrilamida (19:1), 0,067% (p/v) APS, 0,067% (v/v) TEMED, llevado a pH 6,8 con HCl, que sirve para compactar las muestras; y otra parte inferior compuesta por 375 mM Tris, 0,1% (p/v) SDS, 8% (v/v) acrilamida-bisacrilamida (19:1), 10% (v/v) glicerol, 0,08% (p/v) APS, 0,08% (v/v) TEMED, llevado a pH 8,8 con HCl, que sirve para separar las proteínas en función de su tamaño.

Las electroforesis se llevan a cabo en un sistema *Mini-PROTEAN-3* (Bio-Rad) con un tampón de electroforesis Tris-glicina compuesto por 0,19 M glicina y 0,1% (p/v) SDS, llevado a un pH 8,3 con Tris y a un voltaje de 80-100 V. En los casos en que se necesita visualizar las proteínas en el gel se realiza la tinción de las proteínas con una solución de colorante Coomassie (50% v/v metanol, 10% v/v ácido acético y 0,05% p/v Coomassie Blue R-250). Los lavados para eliminar el exceso de colorante en el gel se realizan con una solución de 10% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético.

3.20.6 Análisis “Western Blot”

La detección inmunológica con anticuerpos específicos de proteínas se realizó transfiriendo las proteínas resueltas desde geles SDS/PAGE a membranas de nitrocelulosa,

técnica conocida como “Western Blot” (Burnette, 1981). Una vez terminada la electroforesis, se transfieren las proteínas a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham) situando la membrana en contacto con el gel y efectuando una electroforesis perpendicular al gel en el tampón de transferencia Towbin (Towbin *et al*, 1979) compuesto por 0,19 M glicina, 25 mM Tris, 0,2% (p/v) SDS y 20% (v/v) metanol, la transferencia se lleva a cabo en 90 minutos a 4 °C y un voltaje de 100 V. La transferencia de las proteínas a la membrana se visualiza mediante la tinción con una solución del colorante Ponceau S (0,1% p/v colorante Ponceau S, 1% v/v ácido acético). El exceso de colorante se elimina lavando la membrana con agua.

Posteriormente se incuba la membrana con solución de bloqueo compuesta por tampón TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6), 0,1% (v/v) Tween 20 y 2% (p/v) de leche desnatada en polvo, para reducir la unión del anticuerpo a zonas inespecíficas de la membrana, durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Después se vuelve a incubar la membrana con la solución de bloqueo donde se ha añadido el anticuerpo primario (dilución 1:2500 para anti-GFP, dilución 1:5000 para anti-AHA, dilución 1:10000 para anti-HA, dilución 1:15000 para anti-AKT1) durante 14-16 horas a 4 °C con agitación suave. Luego la membrana se lava 4 veces con tampón TBS y 0,1% (v/v) Tween 20 durante 10 minutos cada vez y finalmente se incuba con el anticuerpo secundario añadido a la solución de bloqueo a una dilución 1:5000 (ECL anti-Mouse (Amersham) para el anticuerpo primario anti-HA, ECL anti-Rabbit (Amersham) para los anticuerpos primarios anti-AHA3 y anti-GFP, y anti-Rabbit IgG (Promega) para el anticuerpo primario anti-AKT1), durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se lava la membrana 3 veces durante 10 minutos con tampón TBS y 0,1% (v/v) Tween 20.

Para detectar AKT1 se realizó el último lavado con tampón de fosfatasa alcalina (0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 M Tris-HCl pH 9) y se llevó a cabo la reacción en color de la fosfatasa alcalina utilizando el kit “*Blotting Detected Reagent*” (Promega) incubando la membrana en 10 ml de tampón de fosfatasa alcalina con 66 µl de una solución 5% (p/v) NBT (Nitroazul de tetrazolio) en 70% (v/v) de dimetilformamida y 66 µl de una solución 2,5% (p/v) BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) en dimetilformamida pura. En el caso de la detección de AHA, GFP y la proteína recombinante con el epítipo HA, se utilizó el kit “*ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*” (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.21 Ensayos enzimáticos

3.21.1 Medida de la actividad H⁺-ATPasa

La actividad H⁺-ATPasa fue medida por determinación de Pi (fósforo inorgánico) según Serrano (1978). Se emplean placas de 96 pocillos (Greiner) donde se colocan 65 µl de una solución de tampón ATPasa (50 mM Mes-Tris pH 6,5, 5 mM MgSO₄, 50 mM KNO₃, 5 mM azida de sodio, 0,2 mM molibdato de amonio) y ATP 0,1 M pH 6,5 en las proporciones 50:1 respectivamente y 5-10 µl de extracto de proteínas (aproximadamente 15-20 µg de proteína total) y se incuba a 30 °C durante 30 minutos. Se añaden 130 µl de una solución de reactivo P_i (2% v/v H₂SO₄, 0,5% p/v molibdato de amonio, 0,5% p/v SDS) y ácido ascórbico 10% en las proporciones 100:1, respectivamente, se mezcla e incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente se mide la absorbancia en un lector de placas Model 550 (Bio-Rad) a 690 nm. Se emplea un control donde no se pone extracto de proteínas y otro donde no se coloca ATP; los valores que dan estos controles se restan del resultado de la reacción ya que estos valores representan el P_i que estaba presente en el extracto de proteínas y en el ATP antes de empezar el ensayo enzimático.

3.21.2 Ensayo de la actividad sulfidril oxidasa

El ensayo de la actividad sulfidril oxidasa de la proteína recombinante se lleva a cabo incubando 50 pmoles de proteína purificada, 0,1 ml de tampón fosfato (50 mM tampón potasio-fosfato pH 7,5, 0,3 mM EDTA) y sustratos reducidos correspondientes a 100 nmoles de grupos sulfidrilo, a 25 °C durante 5 minutos. Luego se añaden 0,8 ml de tampón fosfato, 0,1 ml de reactivo de Ellman (DNTB) a una concentración final de 10 µM y se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos. Finalmente se mide la absorbancia a 412 nm.

Se lleva un control para cada sustrato reducido donde no se añade proteína purificada, este control sirve para conocer el contenido inicial de grupos sulfidrilo en la solución de incubación. En el caso de las medidas de actividad a diferentes pH, se empleo el tampón Mes-Tris para un pH de 5,5 y 6,5 (50 mM tampón Mes-tris pH 5,5-6,5, 0,3 mM EDTA) y el tampón Tris-Mes para un pH de 7,5 (50 mM tampón Tris-Mes pH 7,5, 0,3 mM EDTA).

Para los cálculos del número de nmoles de grupos sulfidrilo que han sido oxidados por la enzima durante la incubación se usa el coeficiente de extinción de 14 mM⁻¹.cm⁻¹ (Levitan *et al.*, 2004) y se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles grupos sulfidrilos oxidados} = \frac{A_{412} (\text{sin proteína}) - A_{412} (\text{con proteína})}{\text{Coeficiente de extinción} \cdot \text{Volumen cubeta (1ml)}}$$

Para calcular el número de actividad molar³ que se define como la cantidad de grupos sulfidrilos oxidados por minuto en relación a la molaridad de la enzima, se empleó la siguiente fórmula

$$\text{Actividad molar} = \frac{\text{nmoles grupos sulfidrilos}}{\text{minutos} \cdot \text{nmoles proteína}}$$

³ También conocido como número de recambio, se define como la cantidad de sustrato transformado en unidad de tiempo por una cantidad dada de enzima.

Resultados

4.1 Rastreo de líneas de inserción de T-DNA

Se rastrearon las líneas mutantes de T-DNA que poseen el vector pSKI015 con 4 secuencias 35S activadoras de la transcripción. Para ello se usaron el set 1 y 2 de la colección de semillas de Weigel, estas líneas mutantes también son conocidas como “*activation tagging lines*” (ver apartado 3.1.1).

4.1.1 Condiciones de búsqueda

La elección de la concentración de la sustancia tóxica es fundamental a la hora de realizar cualquier rastreo, ya que determina el número de candidatos que se obtendrán. Al realizar un rastreo de líneas mutantes que sean tolerantes a noespermidina, es necesario establecer cuál es la concentración de noespermidina en el medio de cultivo a la cual el ecotipo silvestre *Col-7* no es capaz de establecer la plántula. Para ello se sembraron aproximadamente 1000 semillas por placa de *Col-7* en medio MS sólido con 3% de sacarosa donde se añadió diferentes concentraciones crecientes de noespermidina, entre 2 y 4 mM aumentando de 0,2 en 0,2 mM. Se observó la germinación y el establecimiento de plántula entre los 4 y los 10 días, ya que a mayor concentración de noespermidina es necesario más días para la germinación y aparición de cotiledones. Estos ensayos permitieron observar que a los 10 días las semillas habían germinado en todas las concentraciones, pero solo se observaron cotiledones verdes y completamente desarrollados en concentraciones menores a 3 mM. Así que las condiciones elegidas para el rastreo de las líneas mutantes fueron de 1000 semillas por placa en medio MS con 3% de sacarosa y suplementado con 3,2 mM de noespermidina. Por otra parte, se decidió considerar candidatos de tolerancia a noespermidina a las plántulas que presentaban cotiledones verdes y completamente desarrollados a los 7 días. A este primer rastreo se le llamó rastreo primario.

Posteriormente, la descendencia de los candidatos seleccionados fue analizada y se confirmó o descartó su tolerancia a noespermidina, a este proceso se le llamo rastreo secundario. Para determinar las condiciones óptimas del rastreo secundario, primero se determinó si existe una correlación entre la densidad de semillas y la concentración tóxica de noespermidina en el medio. Para ello se sembraron 100-150 semillas, por placa, de *Col-7* en medio MS con 3% de sacarosa donde se agregaron concentraciones crecientes de noespermidina, entre 2 y 4 mM aumentando de 0,2 en 0,2 mM y se observó que cuanto menor es la densidad de semillas por placa de cultivo, menor es la concentración de

noespermidina que resulta tóxica. Así que las condiciones a emplear en el rastreo secundario fueron de 100-150 semillas por placa en medio MS con 3% de sacarosa y suplementado con 2,8 mM de noespermidina y en este caso el criterio de confirmación de tolerancia a noespermidina fue la presencia de cotiledones verdes y desarrollados a los 6 días.

4.1.2 Aislamiento de mutantes resistentes a noespermidina

En el rastreo primario se analizaron 16398 líneas (aproximadamente 164000 semillas) según se describe en el apartado 3.7.1. Como resultado se obtuvieron 210 posibles candidatos (población S₁) que eran capaces de germinar y desarrollar cotiledones verdes después de 7 días en medio con 3,2 mM de noespermidina (Figura 4.1). Los 210 individuos de la población S₁ fueron rescatados del medio con noespermidina y colocados en macetas individuales para obtener la siguiente generación (población S₂).

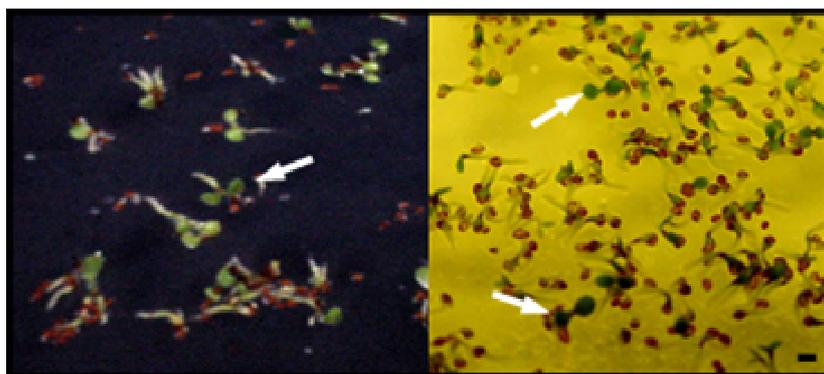


Figura 4.1 Detalle de dos placas del rastreo primario en fondo oscuro y en fondo claro. Las flechas señalan plántulas S₁ aisladas del rastreo primario como posibles candidatos de resistencia a noespermidina. Estas plántulas muestran cotiledones verdes y expandidos mientras que el resto solo muestra emergencia de radícula o no germina. Fotos tomadas a los 7 días en medio MS 3% sacarosa con 3,2 mM noespermidina. La escala corresponde a 1 mm.

Tras recoger individualmente las semillas de los 210 individuos del rastreo primario (población S₂) se desarrolló el rastreo secundario con la descendencia de estos individuos. En el rastreo secundario, se comprobó nuevamente la tolerancia a noespermidina observando el porcentaje de plántulas con cotiledones verdes presentes a los 6 días en un medio suplementado con 2,8 mM de noespermidina y se obtuvieron 8 candidatos con diferentes grados de tolerancia a noespermidina respecto al control silvestre (Figura 4.2).

Estas líneas mutantes presentan, en cultivo *in vitro*, un fenotipo de mayor porcentaje de plántulas con cotiledones en diferentes concentraciones de noespermidina (Figura 4.3.A) y de mejor desarrollo de la parte vegetativa en presencia de noespermidina (Figura 4.3.B).



Figura 4.2 Grado de tolerancia a noespermidina de los mutantes aislados en el rastreo comparado con el control silvestre (*Col-7*). El nivel de tolerancia a noespermidina fue determinado por el porcentaje de cotiledones verdes presentes a los 6 días en un medio suplementado con 2,8 mM de noespermidina.

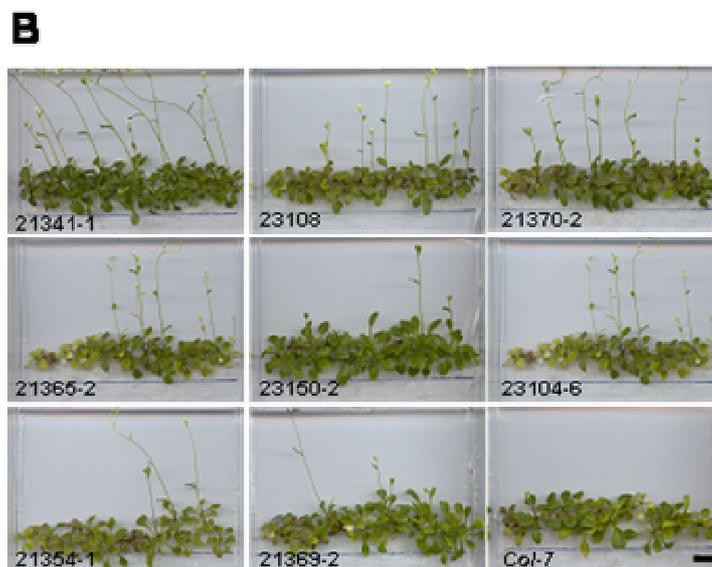
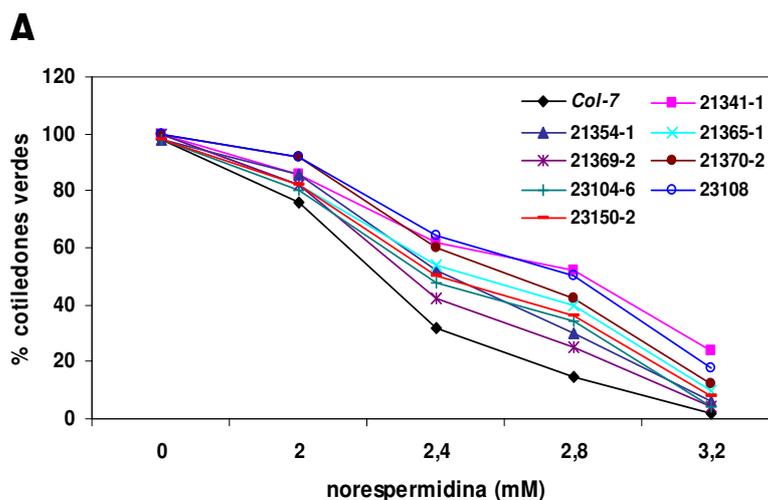


Figura 4.3 A) Porcentaje de cotiledones verdes en noespermidina de las líneas tolerantes obtenidas en el rastreo. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa con diferentes concentraciones de noespermidina y se obtuvieron los datos a los 6 días. B) Fenotipo de tolerancia a noespermidina en placas verticales. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa con 1,4 mM noespermidina; la foto fue tomada a los 18 días. La escala corresponde a 2 cm.

4.1.3 Determinación del número de inserciones de T-DNA

Los mutantes aislados provienen de una colección de líneas mutagenizadas con T-DNA, por lo que se procedió a realizar un análisis “Southern Blot”, empleando sondas específicas del T-DNA (ver apartado 3.7.2), para comprobar su presencia en el genoma de los mutantes aislados (Figura 4.4). Este análisis permitió concluir lo siguiente:

- Los mutantes 21354-1, 23150-2, 23104-6 y 21369-2 no poseen ninguna inserción de T-DNA en su genoma.
- El mutante 23108 presenta una inserción de T-DNA que parece estar completa ya que hibrida con dos sondas específicas localizadas al principio y al final del mismo.
- Los mutantes 21341-1 y 21365-2 presentan 4 y 3 inserciones de T-DNA respectivamente, que parecen estar completas puesto que hibridan con las dos sondas específicas del T-DNA.
- El mutante 21370-2 presenta varias inserciones de T-DNA, 4 de las cuales parecen ser inserciones de T-DNA completas.

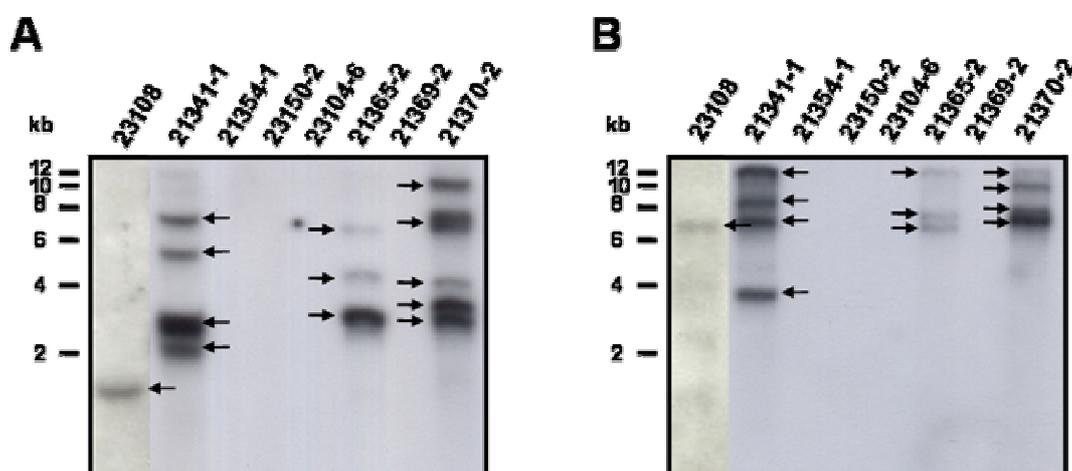


Figura 4.4 Identificación de las inserciones de T-DNA en las líneas tolerantes a norespermidina. Las membranas contienen 1 µg de DNA genómico por cada línea, el DNA fue digerido con la enzima *Bam*H I. Las membranas fueron hibridadas con la sonda 35S (A) y la sonda BAR (B). Las flechas indican las inserciones de T-DNA de cada línea. A la izquierda de cada figura se muestra el tamaño de las bandas del marcador 1Kb en kilobases (kb).

Considerando los resultados del análisis “Southern Blot”, junto con los datos de tolerancia a norespermidina de la figura 4.2, se eligió el mutante 21341-1 para proceder al análisis genético y fenotípico. Este mutante se eligió por presentar una mayor tolerancia a norespermidina que los otros candidatos y por contener el T-DNA en su genoma lo que podría

facilitar (en caso de que el T-DNA fuera el causante del fenotipo) la localización de la mutación en el genoma. Este mutante se denominó *par1* (“polyamine resistant 1”).

4.2 Análisis genético del mutante *par1*

El análisis genético se realiza con el fin de lograr los siguientes objetivos:

1. Localizar la posición de la mutación en el genoma.
2. Determinar la dominancia o recesividad de la mutación.
3. Comprobar si el fenotipo observado es debido a una única mutación.
4. Establecer una correlación entre el fenotipo y la presencia del T-DNA.
5. Determinar si el fenotipo de resistencia a norespermidina se debe a la pérdida o a la ganancia de función de un gen, por la presencia del T-DNA.

4.2.1 Localización de la inserción de T-DNA en el genoma de *Arabidopsis* mediante rescate plasmídico

Anteriormente se había determinado que el mutante *par1* presenta una integración compleja de T-DNA (Figura 4.4). Mediante el rescate plasmídico (apartado 3.7.5) se consiguió el DNA genómico adyacente al lugar de la inserción del T-DNA, obteniéndose 2 tipos de plásmidos. El primer tipo de plásmido correspondía solamente al T-DNA, en cambio, el segundo tipo de plásmido contenía DNA genómico de la planta, adyacente a la inserción del T-DNA. El resultado de la secuenciación (Figura 4.5.A) y el análisis bioinformático (Figura 4.5.B) del segundo tipo de plásmido indicó la existencia de una inserción de T-DNA en la posición 13132 del BAC T15D22 del cromosoma I, que corresponde a la región 5'UTR del *locus* At1g15030 (Figura 4.5.C). Concretamente el T-DNA estaba insertado en el nucleótido -246 contado a partir del ATG del *locus* At1g15030; este locus está anotado en la base de datos TAIR (www.arabidopsis.org) como un gen de función desconocida.

4.2.2 Estudios de segregación

Para realizar los estudios de segregación se cruzaron plantas mutantes *par1* con el ecotipo silvestre *Col-7* y las generaciones F₁ y F₂ fueron analizadas en medio MS con 2,8 mM de norespermidina. El análisis de la generación F₁ mostró que esta población presentaba un mayor número de plántulas con cotiledones verdes a los 5 días comparada con el ecotipo silvestre, lo que indicaba (de modo preliminar) que la mutación era dominante, de modo que

se analizó la segregación del carácter mediante el análisis estadístico χ^2 (Parker, 1981) empleando como hipótesis una segregación fenotípica del tipo 3:1 (mutante:silvestre) que corresponde a una segregación para el carácter del tipo monogénico dominante. Para ello se analizaron 200 semillas F₂, obtenidas por autofecundación de una planta F₁, donde se observó una segregación del fenotipo mutante:silvestre de 154:46 ($\chi^2 = 0.96$, $p > 0,95$). Estos datos de segregación indicaron que la mutación es dominante y segrega como un único *locus*.

A

```
AGATTCCGAATTAGAATAATTGTTTTTGTCTATCGCCTATAAATACGACGGATCGTAATTGTCGTTTTATCAAAATGTACTTTCATT
TATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTTGAATTGAAAAAAATGGTAATTACTCTTTCTTTCCCATATTGACCATCATACTCATT
GCTGATCCATGTAGTTTCGCCACTTTGTTAGATTTTCGGTTTTGGGTTTTGTCTTTGGTCGATTTCCCTGTCCAGAAATCCCGAT
TAAGCTGTTCCCTTAATCTCTGTCTGAATAAATTTTCCGGCGTGAATTTAGATAGGTGGTTAAAAATTACGAGTAGTGAGGAGT
GTTGTTGCTGTTTTGTTTATTCGGTAAAAAGAAATCGGAAGTTCTTTGTTGTCGTTTGATTCCCTTTGAGAAAAGAGAGATGTTGGGAGCTG
GATTTAACTTCACCTCAGCTTCAGAGAGCTCAAATGACGCTCTTATGGCTGCAGATCGAGTCACACTAAGGATCGTGAGAACGGCTCTGC
ATTGTTGAAACACCATGTTTTCGAGGCATCGTCAAGTAATGTTGGGAACGGTTTTTGGATTCCGGTGACACCATCTGTTCCGGCTCACTATT
ATCTAAGGTTGCTTACATGTCTAGTCAATAACCTTTTCTAAAAAGACAAAAAATTTTCAGCTTAATGGTGTGAAAAATTATGTGTAGA
CAATAGTTAGGGGAAAGANGAGCCAGGATGTTGAGTCTCAAAGTTCCTTATTTCTTCTTGAGAAGGATGGGGAATCGTTTGCCANAAG
TGGAGNGC
```

B

```
Query: 1      ttcgcctactttggtagattttcggttttggtttttgtcttttggtegatttcccctgt 60
              |||
Sbjct: 13132 ttcgcctactttggtagattttcggttttggtttttgtcttttggtegatttcccctgt 13191

Query: 61     tcccagaatctccgattaaagctgcttccttaactctctgtctgaatataaacttttccg 120
              |||
Sbjct: 13192 tcccagaatctccgattaaagctgcttccttaactctctgtctgaatataaacttttccg 13251

Query: 121    gcgtgtaatttagataggtggttaaaattacgagtagtgagagggagtgttgctgctgtt 180
              |||
Sbjct: 13252 gcgtgtaatttagataggtggttaaaattacgagtagtgagagggagtgttgctgctgtt 13311

Query: 181    tgtttattcggtaaaacgaaatcggaaggtctttggtgtcgtttgatctcttttgagaaa 240
              |||
Sbjct: 13312 tgtttattcggtaaaacgaaatcggaaggtctttggtgtcgtttgatctcttttgagaaa 13371
```

C

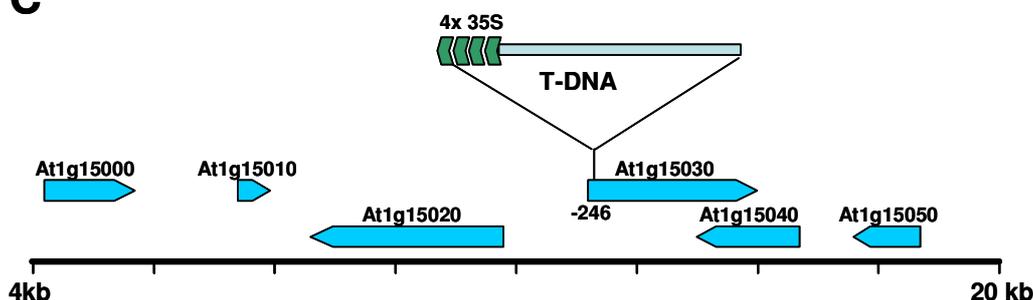


Figura 4.5 A) Secuencia obtenida del rescate plasmídico en el mutante *par1*. En la secuencia se identificaron 3 regiones diferenciadas: el oligonucleótido específico del vector pSKI015 (subrayado), la región correspondiente al vector pSKI015 (negro) y la región genómica flanqueante correspondiente a *A. thaliana* (rojo). B) Resultado del BLAST. Alineamiento de la secuencia obtenida por rescate plasmídico (rojo) indicando la posición exacta de inserción en el BAC T15D22. C) Posición del T-DNA en el BAC T15D22. El esquema indica la posición del T-DNA en la región 5'UTR del *locus* At1g15030. La escala se muestra en kilobases (kb).

4.2.3 Análisis de cosegregación

Una vez confirmada la presencia de al menos una inserción de T-DNA y conociendo que la mutación segrega como un único *locus*, el siguiente paso es determinar si existe correlación entre el T-DNA y el fenotipo de tolerancia a norespermidina. Si el fenotipo mutante está causado por la inserción del T-DNA, todos los individuos F₂ mutantes resistentes a norespermidina poseerán el T-DNA en su genoma. En un primer experimento se utilizaron 12 individuos, procedentes de la generación F₂, que presentaban fenotipo y se realizó un análisis “Southern Blot” para comprobar la presencia del T-DNA. De las 4 inserciones completas de T-DNA incluidas en el genoma de las plantas mutantes, 2 de ellas segregan siempre juntas como un solo *locus* (Figura 4.6.A). Además, como se conocía el lugar de integración del T-DNA en el genoma de las plantas mutantes, se diseñó un oligonucleótido (F30) en la región adyacente a la inserción del T-DNA que junto con el oligonucleótido 5’LB (que hibrida específicamente en el T-DNA) amplifican por PCR un fragmento de 462 pares de bases (pb) solo en los individuos que presenten la inserción de T-DNA. Como resultado de las amplificaciones se observa que las 12 plantas que tenían fenotipo de resistencia a norespermidina presentan el T-DNA (Figura 4.6.B). Para confirmar la cosegregación, se realizó el análisis de 48 individuos más, obteniendo una cosegregación positiva en todos ellos mediante “Southern Blot” y PCR.

4.2.4 Análisis de expresión de genes adyacentes a la inserción de T-DNA en el mutante *par1*

Como la inserción del T-DNA se ubica en la región 5’UTR del *locus* At1g15030 es posible que este gen no se exprese o su expresión se vea reducida, también podría ocurrir que la presencia en el T-DNA de las 4 repeticiones del activador transcripcional 35S (Figura 3.1) aumente la expresión de algún gen adyacente a la inserción de T-DNA. Por lo cual se examinó el BAC T15D22 y se eligió el *locus* At1g15020, ubicado a menos de 2 kb del sitio de inserción del T-DNA (Figura 4.5.C) y el *locus* At1g15030, como *loci* candidatos a presentar una ganancia o pérdida de expresión. A continuación se realizó un análisis “Northern Blot” que mostró que el mutante *par1* presenta un aumento de la expresión del *locus* At1g15020 y una disminución de la expresión del *locus* At1g15030 comparado con el control silvestre (Figura 4.7.A).

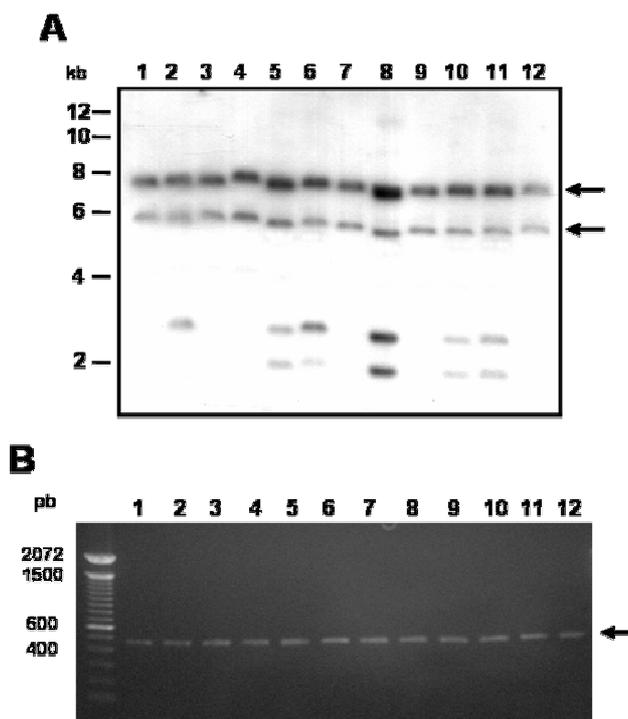


Figura 4.6 A) “Southern Blot” de los individuos F₂ del mutante *par1*. La membrana contiene 1 µg de DNA genómico que fue digerido con la enzima *BamH* I e hibridado con la sonda 35S. Las flechas indican las inserciones de T-DNA que cosegregan con el fenotipo de tolerancia a norespermidina. A la izquierda se muestra el tamaño de las bandas del marcador 1 Kb en kilobases (kb). **B) PCR de los individuos F₂ del mutante *par1*.** Se utilizaron los oligonucleótidos F30 y 5’LB para la reacción de PCR. La flecha indica la posición de la banda de 462 pb que se encuentra presente en todos los individuos resistentes a norespermidina. A la izquierda se muestra el tamaño de las bandas del marcador 123 bp en pares de bases (pb). Cada número se refiere a un individuo de la generación F₂.

El siguiente paso fue determinar si el fenotipo de tolerancia a norespermidina está asociado a la disminución de la expresión del *locus* At1g15030 o al aumento de la expresión del *locus* At1g15020. Así que se utilizó una línea homocigota mutante en el *locus* At1g15030 (Figura 4.7.B) correspondiente a la línea de inserción de T-DNA SALK_078313 (*upr1-1*) de la base de datos SIGnAL (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Las líneas SALK, suministradas por el NASC, son líneas segregantes (Alonso *et al.*, 2003), así que se procedió a obtener las líneas homocigotas para las inserciones de T-DNA mediante PCR diagnóstica, como se explica en el apartado 3.16.3. Por otra parte, se obtuvieron líneas transgénicas sobreexpresando el *locus* At1g15020 (líneas 1.2 y 1.10), cuyo cDNA fue obtenido de *RIKEN BRC Experimental Plant Division* (<http://www.brc.riken.jp/lab/epd/Eng/>).

Mientras que el mutante *upr1-1* no mostró diferencias con el control silvestre, en las líneas 1.2 y 1.10 se observó un mayor porcentaje de cotiledones verdes a diferentes concentraciones de norespermidina (Figura 4.7.C). Así se comprobó que el aumento en la expresión del *locus* At1g15020 es el causante del fenotipo de tolerancia a norespermidina.

Finalmente mediante un análisis de RT-PCR cuantitativa se determinó que el mutante *par1* presenta unos niveles de expresión relativos del locus At1g15020 de aproximadamente 2,5 veces superior al control silvestre (Figura 4.7.D)

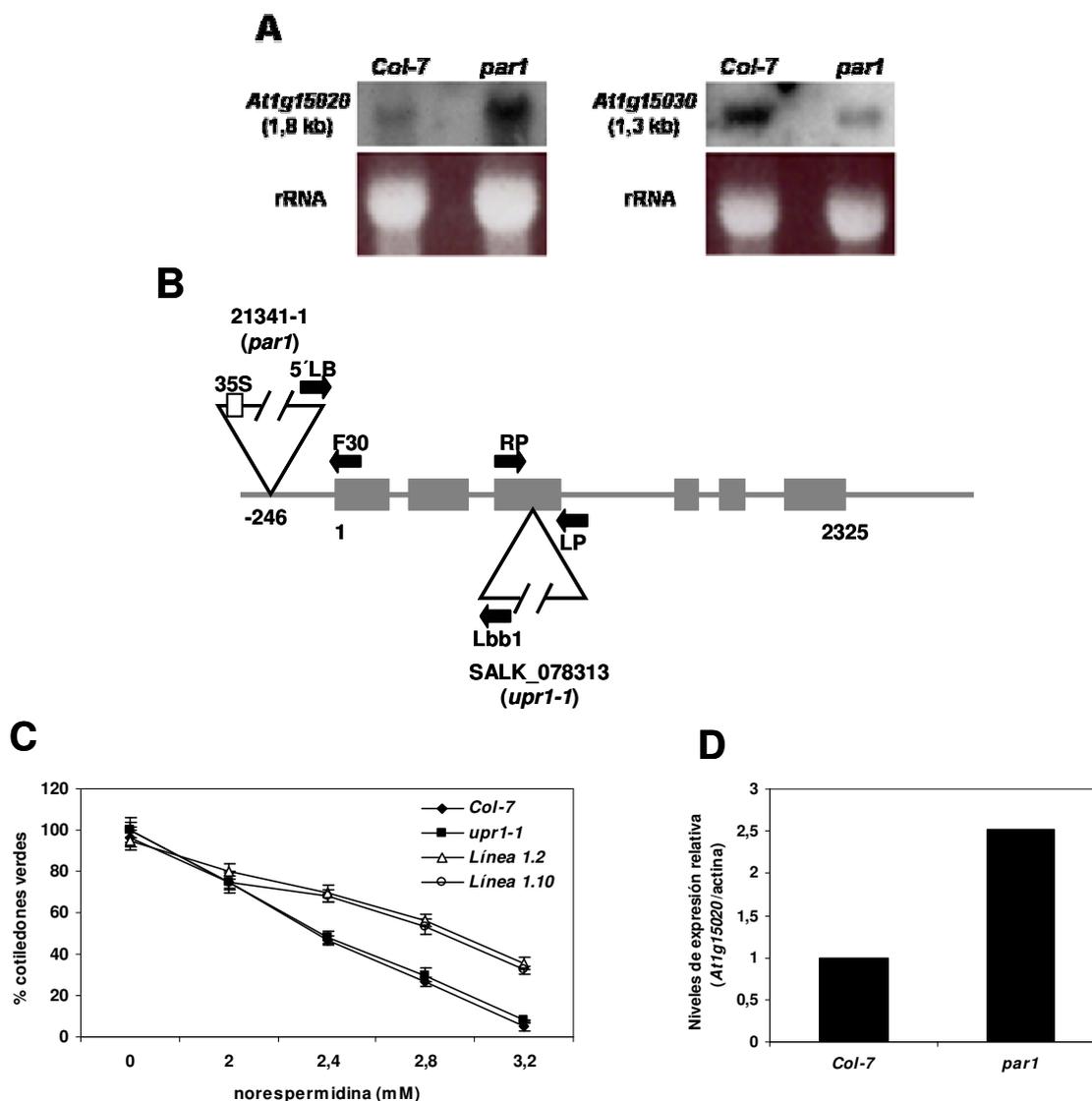


Figura 4.7 A) “Northern Blot” de los genes adyacentes a la inserción de T-DNA. La membrana contiene 20 μg de RNA por muestra que fue hibridada con sondas específicas para los loci At1g15020 y At1g15030. El control de carga de RNA fue determinado mediante la tinción con bromuro de etidio del RNA ribosomal (rRNA). El tamaño de los RNA mensajeros es indicado en kilobases (kb). **B)** Posición relativa de las inserciones de T-DNA en el locus At1g15030. El alelo *par1* presenta la inserción de T-DNA del vector pSKI015 y el alelo *upr1-1* (identificado en la base de datos SIGnAL) presenta la inserción del T-DNA del vector pROK2. Los triángulos indican la posición del T-DNA en el gen. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos utilizados para la PCR diagnóstica y análisis de correlación. **C)** Porcentaje de cotiledones verdes del alelo mutante *upr1-1* y las líneas transgénicas 1.2 y 1.10. El alelo mutante *upr1-1* corresponde a la pérdida de función del locus At1g15030 y las líneas transgénicas 1.2 y 1.10 corresponden a la sobreexpresión del locus At1g15020. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa con diferentes concentraciones de norespermidina y se obtuvieron los datos a los 6 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno ($n=6$). **D)** Expresión del locus At1g15020 mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión del locus At1g15020 se expresan en función de la expresión en el control silvestre (valor de 1). Los valores de expresión fueron normalizados utilizando los valores de C_T del gen *ACT8* (actina).

4.2.5 Identificación de nuevos alelos mutantes en el *locus* At1g15020

Debido a que el aumento de expresión del *locus* At1g15020 provocaba el fenotipo de tolerancia a norespermidina, podría ocurrir que la pérdida parcial o total de la expresión de este *locus* causara sensibilidad a norespermidina. Para comprobar esta hipótesis se realizó una búsqueda de alelos mutantes en el *locus* At1g15020 utilizando la base de datos SIGnAL y se identificaron 3 alelos independientes (Figura 4.8) correspondientes a las líneas de inserción de T-DNA SALK_066130 (*par1-2*), SALK_025237 (*par1-3*) y SALK_072829 (*par1-4*). Dado que las líneas SALK son líneas segregantes (Alonso *et al.*, 2003), se procedió a obtener las líneas homocigotas para las inserciones de T-DNA mediante PCR diagnóstica como se explica en el apartado 3.16.3.

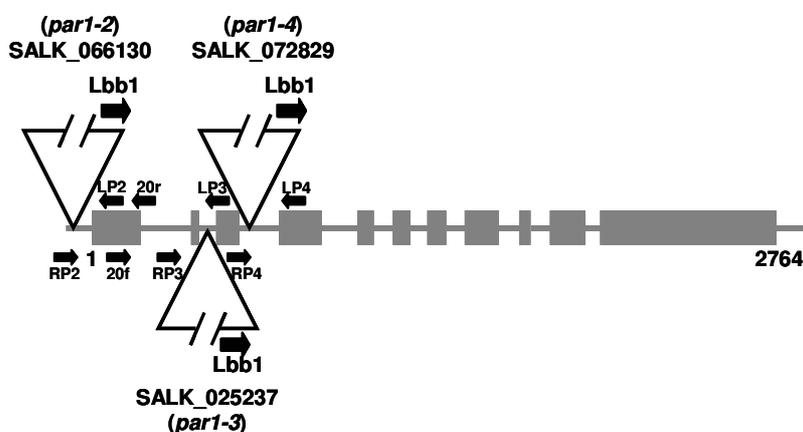


Figura 4.8 Posición relativa de las inserciones de T-DNA en el *locus* At1g15020. Los triángulos indican la posición del T-DNA en el gen. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos utilizados para la PCR diagnóstica (LP/RP) y RT-PCR cuantitativa (20f/20r).

4.2.6 Expresión del *locus* At1g15020 en los alelos mutantes

Debido a que las inserciones de T-DNA en los distintos alelos mutantes del *locus* At1g15020 se ubican tanto en la región 5'UTR como en el marco abierto de lectura, se examinó si la expresión de dicho *locus* se encuentra afectada en los diferentes mutantes *par1* usando RT-PCR cuantitativa. El nivel de expresión del *locus* At1g15020 en los alelos mutantes *par1-2* y *par1-3* es aproximadamente 8 y 6 veces menor, respectivamente, que en el control silvestre; mientras que la expresión del *locus* en el mutante *par1-4* fue casi nula (Figura 4.9.A). Esto puede ser debido a que la inserción de T-DNA en el mutante *par1-2* se encuentra en la región promotora (5'UTR), por lo que el cDNA quedaría intacto y podría provocar una disminución en los niveles del transcrito pero no una eliminación total de su expresión. Por otro lado, el T-DNA en el mutante *par1-3* se ubica en un intrón, donde no

interrumpe la secuencia codificante del cDNA y quizás es eliminado cuando se produce la maduración del mRNA (splicing), debido a esto, esta inserción produciría una disminución en vez de una pérdida de expresión del gen. Como se ve en la figura 4.9.B, los alelos mutantes *par1-2*, *par1-3* y *par1-4* presentan el mismo fenotipo de sensibilidad a noespermidina, por lo que se puede concluir que tanto la disminución como la ausencia de expresión del *locus* At1g15020 producen un fenotipo similar.

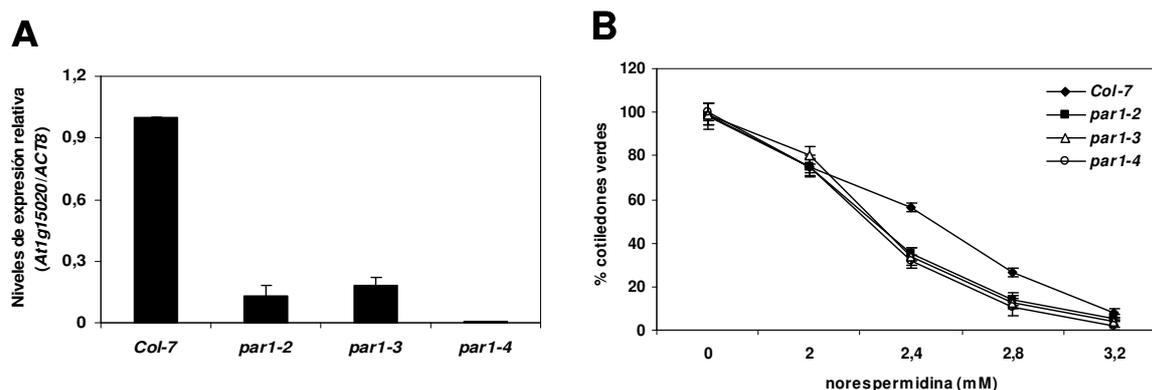


Figura 4.9 A) Expresión del *locus* At1g15020 en los alelos mutantes mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión del *locus* At1g15020 se indican en función de la expresión en el control silvestre (valor de 1). Las barras de error representan la desviación estándar de 3 muestras independientes. Los valores de expresión fueron normalizados utilizando los valores de C_T del gen *ACT8* (actina). **B) Porcentaje de cotiledones verdes en los alelos mutantes del *locus* At1g15020.** Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa con diferentes concentraciones de noespermidina y se obtuvieron los datos a los 6 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=6)

4.3 Caracterización fenotípica de los alelos *par1*

Después de determinar que existe una inserción de T-DNA en el *locus* At1g15030, que la mutación es dominante, que el T-DNA esta ligado al fenotipo de tolerancia a noespermidina y que dicho fenotipo es debido a la sobreexpresión del *locus* At1g15020, se realizó una caracterización fenotípica detallada de los alelos mutantes *par1*. Debido a que el mutante *par1* obtenido del rastreo es tolerante a noespermidina y presenta una mutación dominante, a partir de ahora se denominara *par1-1D*.

4.3.1 *par1-1D* presenta un fenotipo pleiotrópico de tolerancia a cationes tóxicos

Para la caracterización fenotípica se analizó la germinación y establecimiento de plántula en medio MS sólido con 1% o 3% de sacarosa suplementado con diferentes sustancias a niveles tóxicos.

En primer lugar se empleó noespermidina, espermidina, espermina y putrescina para comprobar si el fenotipo de resistencia era específico para noespermidina o general para poliaminas. En la figura 4.10 se observa que el mutante *par1-1D* presenta un mayor porcentaje de individuos con cotiledones verdes en medio con noespermidina y espermidina comparado con el control a 1% y 3% de sacarosa. Sin embargo, el mutante *par1-1D* no presenta ninguna diferencia en medios con espermina o putrescina comparado con el control silvestre (datos no mostrados).

También se realizaron pruebas con NaCl, LiCl, MgCl₂, MnCl₂, ZnSO₄ y CsCl para determinar si el mutante *par1-1D* presentaba algún fenotipo en presencia de cationes mono y divalentes. En este caso, solo se observó un mayor porcentaje de cotiledones verdes en medio con NaCl y LiCl en el mutante *par1-1D* comparado con el control silvestre (Figuras 4.10.A y 4.10.B). Finalmente para determinar si la tolerancia a NaCl se debía al componente osmótico o a un efecto oxidativo, se analizó la respuesta del mutante *par1-1D* en medio MS suplementado con manitol y H₂O₂ respectivamente, pero no se observaron diferencias en el crecimiento respecto al control silvestre (datos no mostrados).

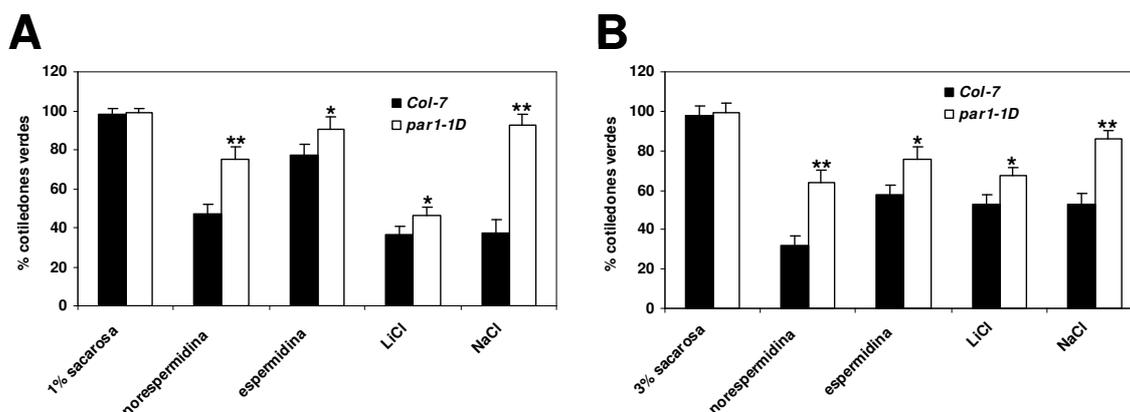


Figura 4.10 Porcentaje de cotiledones verdes del mutante *par1-1D* y el control silvestre (*Col-7*) en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos. En la figura de la izquierda (A) las semillas se sembraron en medio MS 1% sacarosa suplementados con 2,8 mM noespermidina, 7 mM espermidina, 26 mM LiCl y 140 mM NaCl. En la figura de la derecha (B) las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa suplementados con 2,8 mM noespermidina, 7 mM espermidina, 20 mM LiCl y 120 mM NaCl. Los datos fueron tomados a los 6 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=9). * y ** indican que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y *par1-1D*, con un nivel de confianza de 99,5 y 99,9 % respectivamente, mediante una prueba t de Student.

Debido a que la caracterización fenotípica inicial se realizó en medio MS con 1% o 3% de sacarosa y se observaron diferencias significativas en ambas concentraciones, se decidió utilizar para posteriores análisis medio MS con 3% de sacarosa para noespermidina,

espermidina y LiCl, y medio MS con 1% de sacarosa para NaCl. Estos medios se escogieron porque los fenotipos se presentaban más claros y con mayor reproducibilidad.

En resumen, tenemos que el mutante *par1-1D* presenta una mayor tolerancia a noespermidina, espermidina, LiCl y NaCl que el control silvestre en medio MS sólido, este fenotipo de tolerancia esta sustentado no solo en el mayor porcentaje de cotiledones verdes, sino también en el mayor peso fresco de las plántulas (Figura 4.11.A) y en el mayor tamaño de los cotiledones (Figura 4.11.B) del mutante *par1-1D* respecto al control silvestre en medio MS con diferentes cationes tóxicos. En ausencia de estrés, las plántulas *par1-1D* presentan el mismo tiempo de germinación y tamaño que el control silvestre (Figura 4.11.B).

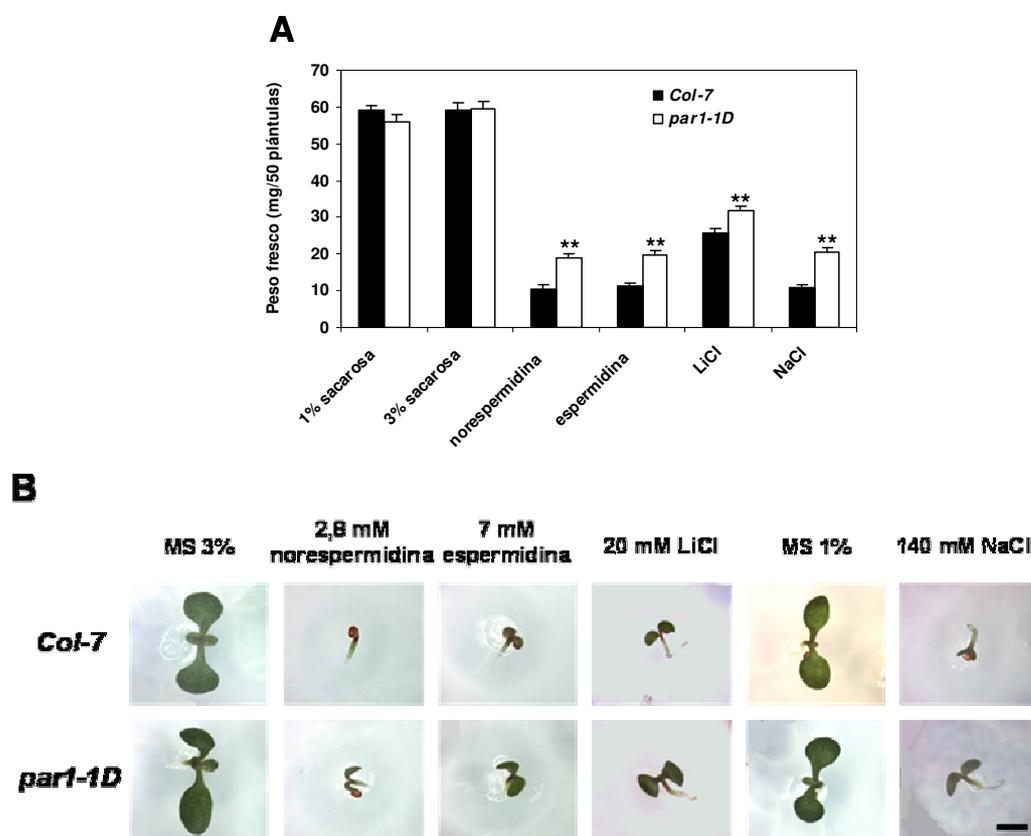


Figura 4.11 A) Peso fresco del mutante *par1-1D* y el control silvestre (*Col-7*) en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa suplementados con 2,8 mM noespermidina, 7 mM espermidina, 20 mM LiCl y en MS 1% sacarosa suplementado con 140 mM NaCl. Los datos fueron tomados a los 6 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes (n=3). ** indica que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y *par1-1D*, con un nivel de confianza de 99,9 % mediante una prueba t de Student. **B) Fenotipo del mutante *par1-1D* en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos.** Las fotos fueron tomadas después de 6 días y muestran una plántula representativa del fenotipo. La escala corresponde a 2 mm.

Asimismo se realizaron experimentos en invernadero para comprobar el fenotipo de tolerancia a NaCl y LiCl en plantas adultas (apartado 3.9). El primer experimento consistió en sembrar semillas del control silvestre y el mutante *par1-1D* en macetas diferentes e irrigarlas periódicamente con solución nutritiva suplementada con NaCl o LiCl. En este experimento se observó que el tamaño de las plantas que alcanzaron la fase adulta (plantas con flores y silicuas) fue mayor en el mutante *par1-1D* (Figura 4.12).

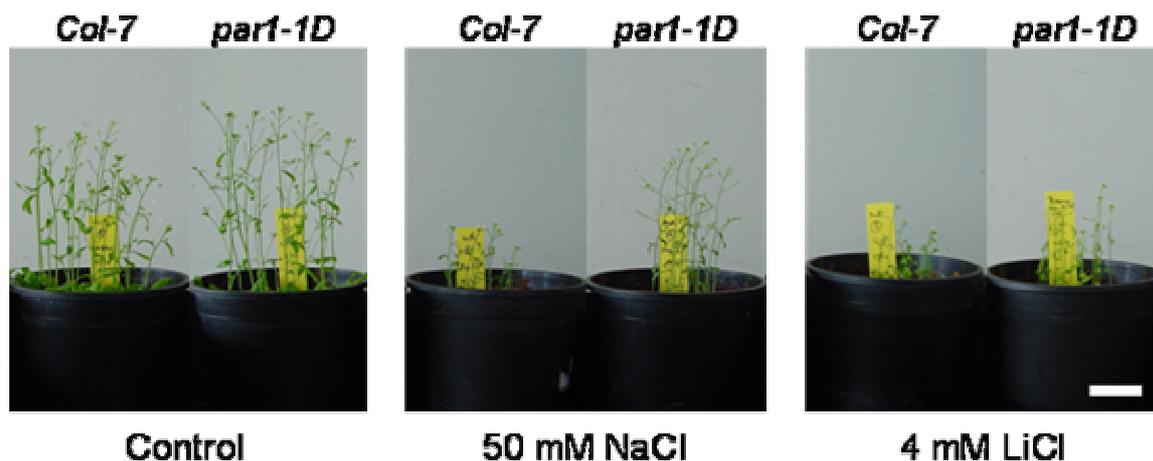


Figura 4.12 Crecimiento del mutante *par1-1D* en condiciones de estrés por NaCl y LiCl. Las macetas fueron irrigadas 2 veces por semana con solución nutritiva (Control) y solución nutritiva suplementada con 50 mM NaCl o 4 mM LiCl. Las fotos fueron tomadas después de 37 días. La escala corresponde a 5 cm. Control silvestre (*Col-7*).

En el segundo experimento, las macetas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con NaCl o LiCl una vez las plantas alcanzaron la fase adulta. En la figura 4.13.A puede observarse como el mutante *par1-1D* presenta un menor daño en la roseta cuando es sometido a un estrés por NaCl, igualmente, cuando el control silvestre y el mutante *par1-1D* son sometidos a un estrés por LiCl se aprecia un menor daño en las hojas de la roseta del mutante *par1-1D* (Figura 4.13.B). Además, el control silvestre presenta un menor número de flores y silicuas, junto con una marchitez de los ápices del tallo principal y tallos secundarios bajo un estrés por LiCl (Figura 4.13.C). Para cuantificar la inhibición del crecimiento y el daño producido por el NaCl y LiCl, se pesaron plantas en ausencia y en presencia de NaCl o LiCl y se observó que el peso fresco de la parte aérea en el mutante *par1-1D*, en ausencia de NaCl o LiCl, era similar al del control silvestre; pero, en presencia de NaCl o LiCl, el peso fresco de la parte aérea del mutante *par1-1D* era mayor (Figuras 4.14.A y 4.14.B).

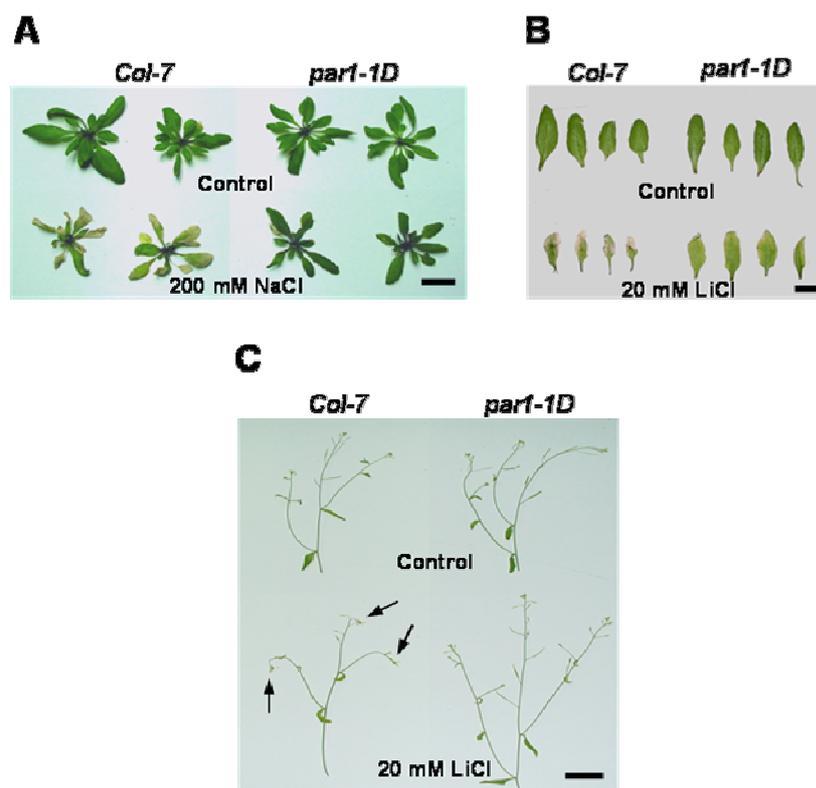


Figura 4.13 A) Fenotipo de la roseta del mutante *par1-1D* después de un estrés salino con NaCl. Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 200 mM de NaCl durante 11 días. La escala corresponde a 2 cm. B) Fenotipo de las hojas de la roseta en el mutante *par1-1D* después de un estrés salino con LiCl. Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 20 mM de LiCl durante 8 días. La escala corresponde a 1 cm. C) Fenotipo de la parte aérea en el mutante *par1-1D* después de un estrés salino con LiCl. Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 20 mM de LiCl durante 6 días. Las flechas indican los ápices florales marchitos. La escala corresponde a 4 cm. Control indica que las plantas fueron irrigadas solo con solución nutritiva. Control silvestre (*Col-7*).

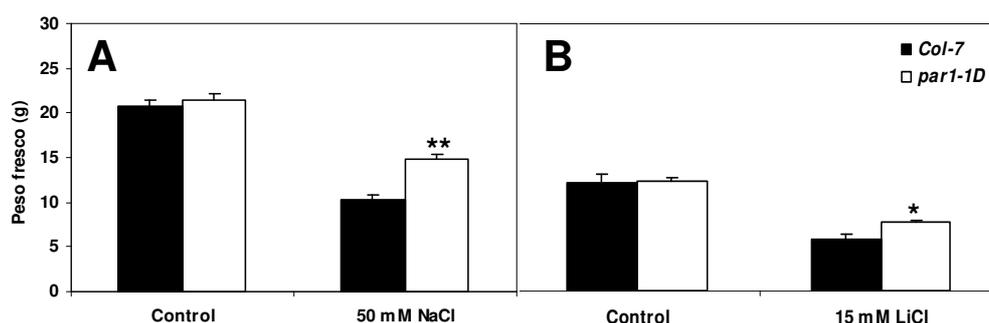


Figura 4.14 Peso fresco de la parte aérea en el mutante *par1-1D* y el control silvestre (*Col-7*) después de un estrés salino con NaCl (A) y LiCl (B). Se colocaron 3 plantas por maceta que fueron irrigadas con solución nutritiva (Control) o con solución nutritiva suplementada con 50 mM NaCl o 15 mM LiCl durante 14 y 6 días respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=6). * y ** indican que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y *par1-1D*, con un nivel de confianza de 99,5 y 99,9 % respectivamente, mediante una prueba t de Student.

4.3.2 *par1-2*, *par1-3* y *par1-4* son sensibles a cationes tóxicos

Se analizó el crecimiento de los mutantes *par1-2*, *par1-3* y *par1-4* en medio MS sólido suplementado con diferentes cationes tóxicos. Como resultado común a todos los mutantes, se observó un menor porcentaje de plántulas con cotiledones verdes con respecto al control en medios con noespermidina, espermidina, LiCl y NaCl (Figura 4.15.A), así como un menor peso de las plántulas (Figura 4.15.B).

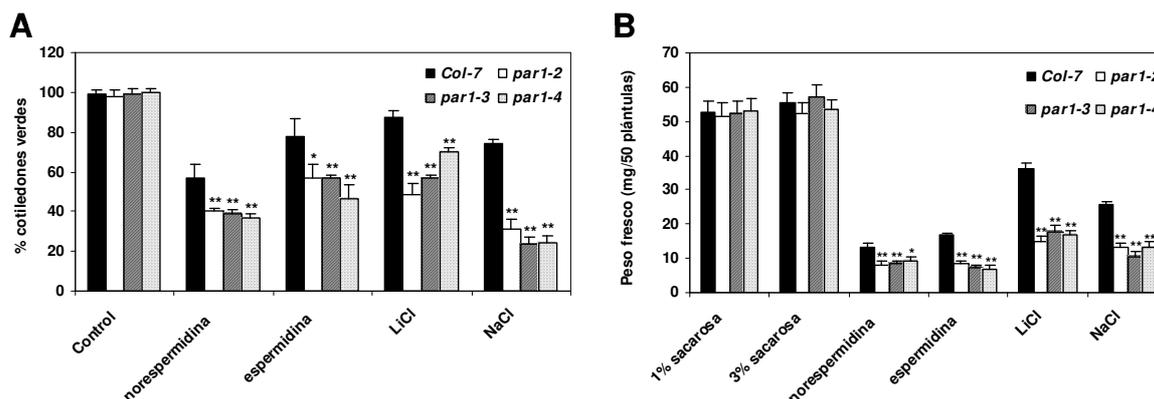


Figura 4.15 Porcentaje de cotiledones verdes (A) y peso fresco (B) de los alelos mutantes del locus *At1g15020* en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa suplementados con 2,4 mM noespermidina, 6 mM espermidina, 18 mM LiCl, y en MS 1% sacarosa suplementado con 120 mM NaCl. Control representa el % de cotiledones verdes presentes en medio MS con 1 y 3% de sacarosa. Los datos fueron tomados a los 6 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=9). * y ** indican que existen diferencias significativas, entre el control silvestre (*Col-7*) y los alelos mutantes, con un nivel de confianza de 99,5 y 99,9 % respectivamente, mediante una prueba t de Student.

Debido a que se tenían 3 alelos mutantes para el locus *At1g15020* que presentaban un comportamiento similar en su sensibilidad a cationes tóxicos y eran indistinguibles del control silvestre en ausencia de estrés en medio MS y en invernadero (datos no mostrados), se decidió utilizar el alelo *par1-2* para todas las caracterizaciones posteriores.

En primer lugar, se observó que el mutante *par1-2* presentaba un menor tamaño y una inhibición del desarrollo de los cotiledones comparado con el control silvestre en medios con diferentes cationes tóxicos (Figura 4.16). Por otra parte, se hicieron experimentos en el invernadero con semillas del control silvestre y el mutante *par1-2* sembradas en tierra e irrigadas periódicamente con solución nutritiva suplementada con LiCl o NaCl. Los resultados mostraron un porcentaje similar de plantas que alcanzaron la fase adulta en ambos tratamientos (datos no mostrados). Asimismo el mutante *par1-2* presentaba un menor tamaño de la roseta, así como un mayor daño en las hojas primarias al ser irrigado con LiCl (Figura

4.17) mientras que no se observó diferencia alguna respecto al control silvestre al tratarse con NaCl (datos no mostrados).



Figura 4.16 Fenotipo del mutante *par1-2* en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos. Las fotos fueron tomadas después de 6 días y muestran una plántula representativa del fenotipo. La escala corresponde a 2 mm. Control silvestre (*Col-7*).

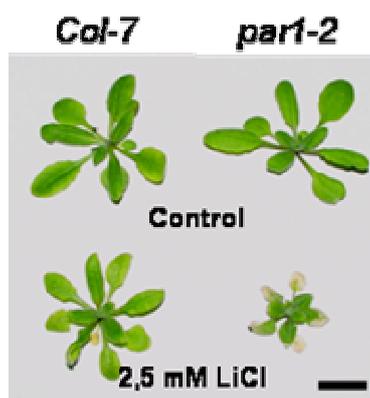


Figura 4.17 Fenotipo de la roseta del mutante *par1-2* en condiciones de estrés por LiCl. Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 2,5 mM de LiCl durante 20 días. La escala corresponde a 2 cm. Control indica que las plantas fueron irrigadas solo con solución nutritiva. Control silvestre (*Col-7*).

Otro experimento consistió en someter plantas adultas a un estrés por NaCl o LiCl. En este caso se observó un daño generalizado en las hojas de la roseta del mutante *par1-2* tratadas con NaCl, mientras que el control silvestre presentaba una acumulación de antocianinas en las hojas pero sin muerte celular o amarillamiento de las hojas de la roseta (Figura 4.18.A). En el caso del LiCl se observó un mayor marchitamiento y pérdida de turgencia en la roseta, así como un marchitamiento más pronunciado en los ápices de los tallos secundarios en el mutante *par1-2* con respecto al control silvestre (Figura 4.18.B y 4.18.C).

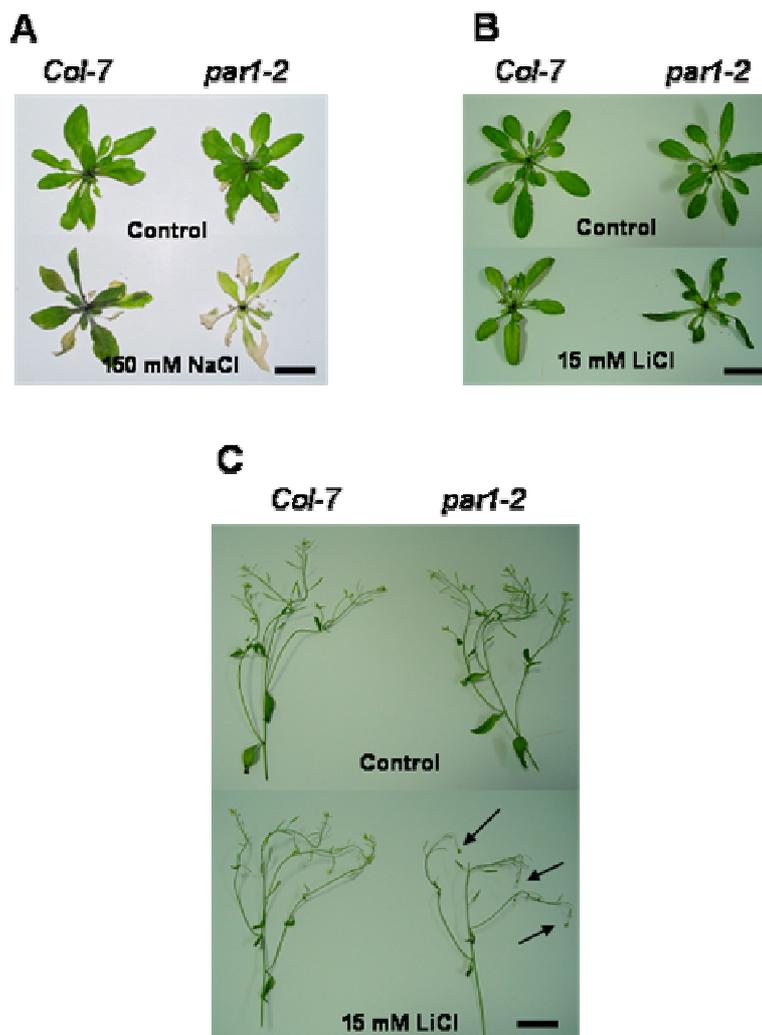


FIGURA 4.18 A) Fenotipo de la roseta en el mutante *par1-2* después de un estrés salino con NaCl. Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 150 mM de NaCl durante 10 días. La escala corresponde a 2 cm. B) Fenotipo de la roseta en el mutante *par1-2* después de un estrés salino con LiCl. Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 15 mM de LiCl durante 8 días. La escala corresponde a 2 cm. C) Fenotipo de la parte aérea en el mutante *par1-2* después de un estrés salino con LiCl. Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 15 mM de LiCl durante 6 días. Las flechas indican los ápices florales marchitos. La escala corresponde a 4 cm. Control indica que las plantas fueron irrigadas solo con solución nutritiva. Control silvestre (*Col-7*).

4.3.3 *par1-1D* presenta una menor toma y acumula menor cantidad de cationes tóxicos en condiciones de estrés

Como hemos visto anteriormente, el mutante *par1-1D* es resistente a cationes tóxicos y uno de los mecanismos por el cual este mutante puede ser resistente a noespermidina, NaCl y LiCl es evitando o disminuyendo la entrada y/o acumulación de cationes tóxicos en el interior de la planta. El mutante *par1-2*, al contrario, es sensible a cationes tóxicos, posiblemente debido a una mayor entrada y/o acumulación de estos cationes en la planta.

Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos de toma de cationes en tiempos cortos (desde 0 a 90 minutos) y de acumulación de cationes en tiempos largos (2 días), según se describe en el apartado 3.11. Los resultados obtenidos en la toma de noespermidina no muestran diferencias en la velocidad inicial de toma, pero permiten observar que a partir de los 30 minutos existe una diferencia en la toma de noespermidina entre los alelos *par1* y el control silvestre siendo la toma de *par1-2* > *Col-7* > *par1-1D*. A partir de los 40 minutos el contenido en noespermidina prácticamente no aumenta, sino que se mantiene hasta los 80 minutos (Figura 4.19.A). La diferencia en la toma de noespermidina parece ser confirmada por el ensayo de acumulación, tras 2 días, donde el mutante *par1-1D* acumula menos noespermidina que el control silvestre mientras que el mutante *par1-2* acumula más (Figura 4.19.B).

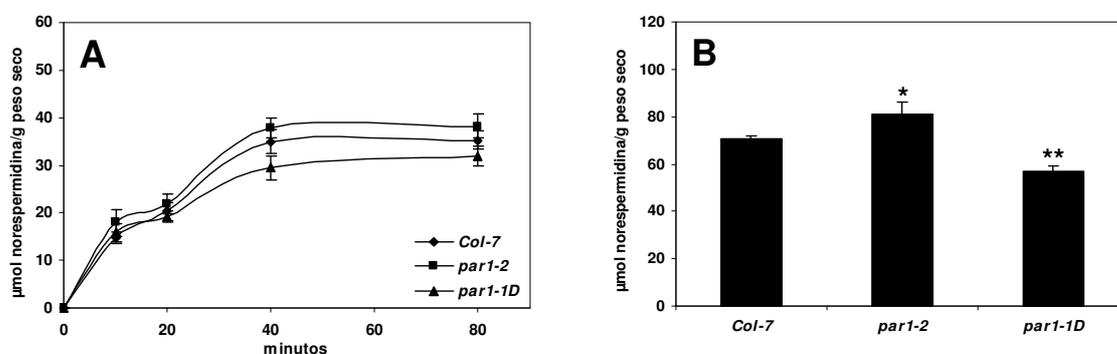


FIGURA 4.19 A) Toma de noespermidina en el control silvestre (*Col-7*) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del locus *At1g15020*. Plántulas crecidas en medio líquido durante 10 días fueron transferidas a un nuevo medio líquido suplementado con 2,8 mM de noespermidina. B) Acumulación de noespermidina en *Col-7* y en los mutantes *par1-1D* y *par1-2*. Plántulas crecidas en medio líquido fueron transferidas a un nuevo medio líquido suplementado con 2,8 mM de noespermidina durante 2 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=9). * y ** indican que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y los alelos mutantes, con un nivel de confianza de 99,5 y 99,9 %, respectivamente, mediante una prueba t de Student.

De igual manera, en los ensayos de toma de Na^+ no se observan diferencias en la velocidad inicial de toma, pero a partir de los 15 minutos se observa una mayor toma de Na^+ en el mutante *par1-2* respecto al control que aumenta hasta los 60 minutos, manteniéndose posteriormente prácticamente constante hasta los 80 minutos. En cambio en el mutante *par1-1D* se observa una ligera, pero continua disminución en la toma de Na^+ a partir de los 15 minutos, mientras el control silvestre aumenta la toma de Na^+ hasta los 30 minutos para luego disminuir y mantenerse en un nivel intermedio entre el mutante *par1-2* y el mutante *par1-1D* (Figura 4.20.A). La diferencia observada en la toma de Na^+ se confirma con el ensayo de acumulación, donde el mutante *par1-2* acumula más Na^+ que el control silvestre y el mutante *par1-1D* menos Na^+ que este último (Figura 4.20.B).

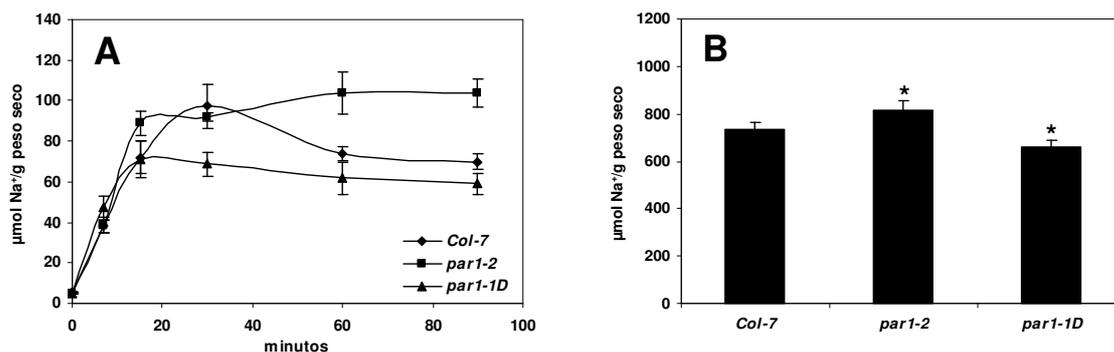


FIGURA 4.20 A) Toma de Na⁺ en el control silvestre (*Col-7*) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del locus *At1g15020*. Plántulas crecidas en medio líquido durante 10 días fueron transferidas a un nuevo medio líquido suplementado con 120 mM de NaCl. B) Acumulación de Na⁺ en *Col-7* y en los mutantes *par1-1D* y *par1-2*. Plántulas crecidas en medio líquido fueron transferidas a un nuevo medio líquido suplementado con 120 mM de NaCl durante 2 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=9). * indica que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y los alelos mutantes, con un nivel de confianza de 99,5%, mediante una prueba t de Student.

En el caso de los ensayos de toma de Li⁺, se observa una diferencia en la velocidad inicial de toma (*par1-2* > *Col-7* > *par1-1D*), pero a partir de los 30 minutos, el contenido de Li⁺ prácticamente no aumenta en el mutante *par1-2* y el control, aumentando solo en el mutante *par1-1D* hasta establecerse aproximadamente a los 60 minutos. Finalmente, a los 90 minutos tenemos solo un aumento en la toma de Li⁺ del mutante *par1-2* respecto al control, pero ninguna diferencia en la toma del mutante *par1-1D* comparado al control (Figura 4.21.A). En el ensayo de acumulación a los 2 días no se observan diferencias entre la acumulación de Li⁺ de los alelos *par1* y el control (Figura 4.21.B).

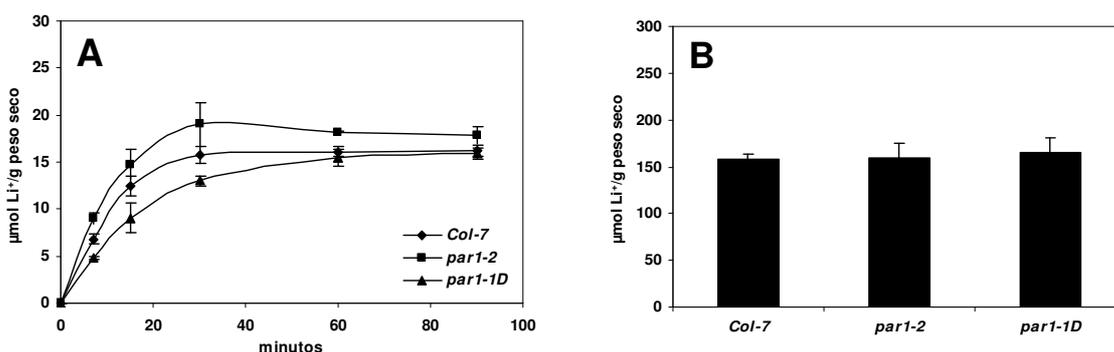


FIGURA 4.21 A) Toma de Li⁺ en el control silvestre (*Col-7*) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del locus *At1g15020*. Plántulas crecidas en medio líquido durante 10 días fueron transferidas a un nuevo medio líquido suplementado con 20 mM de LiCl. B) Acumulación de Li⁺ en *Col-7* y en los mutantes *par1-1D* y *par1-2*. Plántulas crecidas en medio líquido fueron transferidas a un nuevo medio líquido suplementado con 20 mM de LiCl durante 2 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=9).

4.3.4 La acumulación y toma de K^+ varía en los alelos *par1*

En los ensayos anteriores se comprobó que el mutante *par1-1D* toma y acumula menos norespermidina y Na^+ que el control silvestre, además, el mutante *par1-2* toma y acumula más norespermidina y Na^+ que el control. En el caso del Li^+ solo se observó una diferencia en la velocidad inicial de toma y en el contenido de Li^+ a tiempos cortos (0-60 minutos). Estos resultados plantearon la idea de que los alelos *par1* pueden estar afectados en la toma y acumulación de K^+ , ya que una mayor acumulación de K^+ intracelular impide la acumulación de iones tóxicos (como Na^+) y puede disminuir el potencial de membrana impidiendo la entrada inespecífica de cationes (como Na^+ , Li^+ y norespermidina). Para demostrar esta hipótesis, se realizaron ensayos de velocidad inicial de toma de Rb^+ y de acumulación de K^+ . Para los ensayos de toma, se utilizó el catión rubidio (Rb^+) por ser un análogo estructural del K^+ y tener la capacidad de compartir sistemas de entrada y salida.

En los ensayos de toma de Rb^+ no se observan diferencias en la velocidad inicial de toma, pero a partir de los 15 minutos se observa como el contenido de Rb^+ en el mutante *par1-1D* es mayor que en el control, además, el mutante *par1-2* presenta un contenido menor que el control y esta diferencia se mantiene hasta los 120 minutos (Figura 4.22.A). A partir de los 10 minutos y hasta aproximadamente los 30 minutos, el contenido de Rb^+ en los mutantes y el control permanece prácticamente constante, para después aumentar y permanecer casi constante desde los 45 minutos hasta los 120 minutos. La acumulación de K^+ en el mutante *par1-2* fue menor que en el control, pero en el caso del mutante *par1-1D*, el contenido de K^+ fue mayor (Figura 4.22.B).

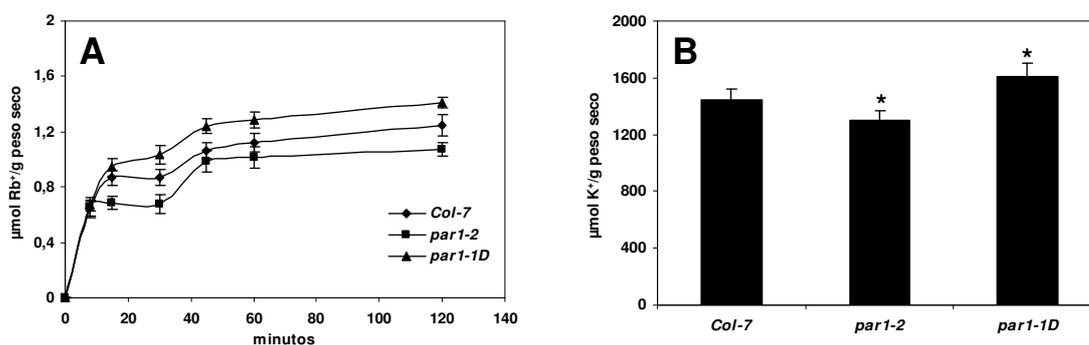


FIGURA 4.22 A) Medida de la toma de Rb^+ en el control silvestre (*Col-7*) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del locus *At1g15020*. Plántulas crecidas en medio líquido durante 10 días fueron transferidas a un nuevo medio líquido sin K^+ y suplementado con 1 mM de $RbCl$. B) Acumulación de K^+ en *Col-7* y en los mutantes *par1-1D* y *par1-2*. Las plántulas fueron crecidas en medio líquido durante 10 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 4 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno ($n=12$). * indica que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y los alelos mutantes, con un nivel de confianza de 99,5%, mediante una prueba t de Student.

4.3.5 El potencial de membrana de la epidermis radicular no está afectado en los alelos *par1*

El potencial de membrana (E_m) en la célula vegetal está regulado principalmente por las H^+ -ATPasas y por los transportadores y canales de K^+ . Cuando aumenta la entrada de K^+ en la célula se produce una depolarización del potencial de membrana, de manera contraria, cuando disminuye la entrada de K^+ tiene lugar una hiperpolarización del potencial de membrana. El aumento en la toma y acumulación de K^+ en el mutante *par1-1D*, así como la menor toma y acumulación de K^+ en el mutante *par1-2* respecto al control podrían provocar una depolarización e hiperpolarización, respectivamente, del potencial de membrana.

Para determinar si los alelos *par1* se encuentran depolarizados o hiperpolarizados se procedió a medir el potencial de membrana de las células epidérmicas de raíz siguiendo la metodología indicada en el apartado 3.14. Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. María J. García y el Prof. Jose A. Fernández de la Universidad de Málaga.

En la tabla V se muestran los resultados de la medición del potencial de membrana, donde se observa que no hay diferencias significativas en el potencial de membrana entre el alelo *par1-2* y el control. La disminución del potencial del mutante *par1-1D* respecto al control no es significativa al nivel de $p=0,01$.

Tabla V. Potencial de membrana (E_m) de las células epidérmicas de raíz en el control silvestre (Col-7) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del locus At1g15020. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar. Entre paréntesis se muestra el número de repeticiones por cada línea.

Línea	E_m (mV)
<i>Col-7</i>	158 \pm 7 (6)
<i>par1-2</i>	153 \pm 8 (5)
<i>par1-1D</i>	147 \pm 8 (6)

4.3.6 Los alelos *par1* están afectados en la acumulación de cationes en la parte aérea

En los ensayos anteriores de acumulación de cationes, se observaron diferencias entre los alelos *par1* y el control, pero no se pudo discernir si esta diferencia en el contenido era a nivel de toda la planta, solo en la parte aérea o en la raíz. Para ello se llevaron a cabo ensayos en invernadero con plantas adultas como se describe en el apartado 3.11.1.

Raíz

Los ensayos de acumulación de cationes en raíz se llevaron a cabo en un sistema de crecimiento hidropónico. En las figuras 4.23.A y 4.23.B, se observa que las plantas irrigadas solo con solución nutritiva (control) prácticamente no contienen Na^+ ni Li^+ en la raíz y además no existen diferencias entre los alelos *par1* y el control *Col-7* en el contenido de K^+ .

Cuando se irrigan las plantas con solución nutritiva suplementada con 50 mM de NaCl, se observa un aumento generalizado en el contenido de Na^+ y una disminución en el contenido de K^+ (Figura 4.23.A) pero no se observan diferencias entre los alelos *par1* y el control *Col-7*. De forma similar, al irrigar las plantas con solución nutritiva suplementada con 10 mM de LiCl se observa una disminución en el contenido de K^+ en la raíz, en los alelos *par1* y el control *Col-7*, pero no se observa diferencia entre ellos (Figura 4.23.B). Además, las plantas irrigadas con LiCl presentan un aumento en la concentración de Li^+ en la raíz. En este caso no existen diferencias en el contenido de Li^+ entre el mutante *par1-2* y el control (*Col-7*), pero sí un menor contenido en el mutante *par1-1D* (Figura 4.23.B).

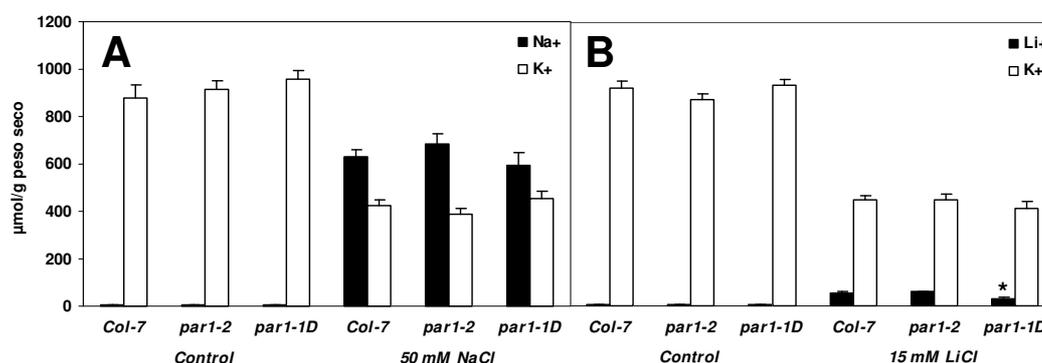


Figura 4.23 Contenido de cationes en la raíz de plantas irrigadas con NaCl (A) y LiCl (B) en el control silvestre (*Col-7*) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del locus *At1g15020*. La figura muestra el contenido de Na^+/K^+ y Li^+/K^+ en la raíz de plantas irrigadas con 50 mM NaCl o 15 mM LiCl durante 2 días. Las plantas control fueron irrigadas con solución nutritiva. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno ($n=6$). * indica que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y *par1-1D*, con un nivel de confianza de 99,5% mediante una prueba t de Student.

Parte aérea

A diferencia de la raíz, en la parte aérea existe una acumulación de Na^+ cuando las plantas son irrigadas solo con solución nutritiva (control), esto se debe a que la turba empleada para crecer las plantas contiene cierta cantidad de Na^+ , sin embargo, es de destacar que el mutante *par1-1D* presenta una menor cantidad de Na^+ que el mutante *par1-2* y el control *Col-7* (Figura 4.24.A). Además, se observa que en condiciones control el mutante

par1-1D tiene mayor contenido de K^+ que el *Col-7*, mientras que el mutante *par1-2* tiene menor cantidad de K^+ .

Cuando las plantas son sometidas a estrés por NaCl, la concentración de Na^+ aumenta en todos los casos, observándose sin embargo un menor contenido de Na^+ en el mutante *par1-1D* comparado con el control *Col-7* (Figura 4.24.A). También se observa un ligero aumento en el contenido de Na^+ del mutante *par1-2* respecto al control *Col-7*, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. Finalmente la figura 4.24.A muestra una disminución general en la cantidad de K^+ . En este caso el mutante *par1-1D* sigue teniendo un mayor contenido de K^+ que el control *Col-7*, pero el mutante *par1-2* no difiere del control *Col-7*.

En plantas irrigadas solo con solución nutritiva no se observa la presencia de Li^+ en la parte aérea, pero cuando las plantas son irrigadas con 15 mM de LiCl, el contenido de Li^+ aumenta en los 3 casos (Figura 4.24.B), siendo dicho contenido mayor en el mutante *par1-2* y menor en el mutante *par1-1D* en comparación con el control *Col-7*. Con respecto al contenido de K^+ , en condiciones control es menor en el mutante *par1-2* y mayor en el mutante *par1-1D*, respecto al control *Col-7*, pero cuando las plantas son sometidas a estrés por LiCl, el contenido de K^+ disminuye en forma general, de manera similar a plantas irrigadas con NaCl. Sin embargo en este caso no se observan diferencias en el contenido de K^+ entre los alelos *par1* y el control *Col-7*, pero sí se observa un mayor contenido de K^+ en el mutante *par1-1D* respecto al mutante *par1-2* (Figura 4.23.B).

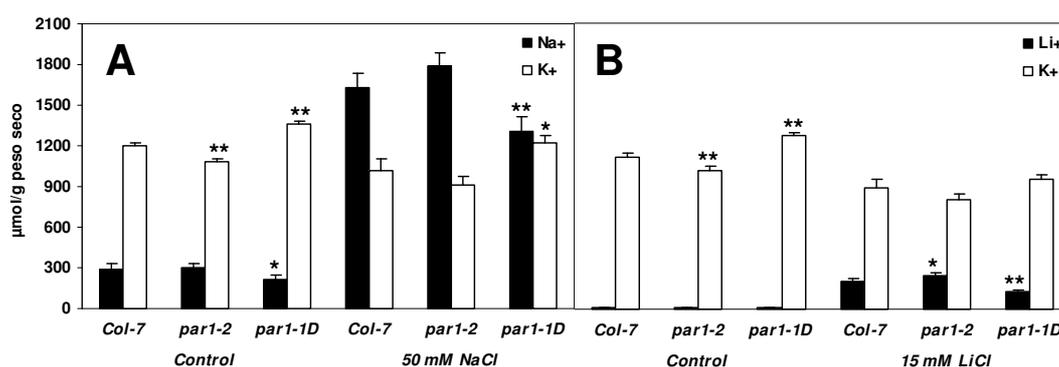


Figura 4.24 Contenido de cationes en la parte aérea de plantas irrigadas con NaCl (A) y LiCl (B) en el control silvestre (*Col-7*) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del locus *At1g15020*. La figura muestra el contenido de Na^+/K^+ y Li^+/K^+ en la parte aérea de plantas irrigadas con 50 mM NaCl o 15 mM LiCl durante 5 y 3 días, respectivamente. Las plantas control fueron irrigadas con solución nutritiva. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=6). * y ** indican que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y los alelos mutantes, con un nivel de confianza de 99,5 y 99,9 % respectivamente, mediante una prueba t de Student.

Los resultados de los ensayos de acumulación de cationes en la parte aérea y la raíz plantean la hipótesis de que los alelos *par1* están afectados en el transporte a larga distancia de cationes, es decir, en la carga de cationes en el xilema de la raíz. Debido a que, en primer lugar, se observan diferencias entre los mutantes y el control *Col-7* en el contenido de K^+ en la parte aérea en condiciones control (Figura 4.24.A y 4.24.B) pero no en la raíz (Figuras 4.23.A y 4.23.B). Además, se observan diferencias en el contenido de Li^+ en la parte aérea en los alelos *par1* (Figura 4.24.B) y solo se ve una ligera disminución en el contenido de Li^+ en el mutante *par1-ID* en raíz (Figura 4.23.B). Y finalmente se observa una disminución en el contenido de Na^+ de la parte aérea (Figura 4.24.A) en el mutante *par1-ID*, pero no se observa variación en el contenido de Na^+ en la raíz (Figura 4.23.A).

4.3.7 Los alelos *par1* están afectados en la acumulación de cationes en el xilema

Para demostrar la hipótesis planteada en el párrafo anterior, se determinó la concentración de cationes en el xilema de plantas irrigadas con NaCl y LiCl y plantas irrigadas solo con solución nutritiva según se detalla en el apartado 3.12.

Las plantas control irrigadas solo con solución nutritiva contienen cantidades muy bajas de Na^+ en el xilema y no contienen Li^+ , además, el mutante *par1-2* presenta un contenido menor de K^+ y el mutante *par1-ID* un contenido mayor de K^+ , en comparación con el control *Col-7* (Figuras 4.25.A y 4.25.B).

Cuando las plantas son regadas con solución nutritiva suplementada con 50 mM de NaCl, el contenido de K^+ prácticamente no disminuye y se mantienen las diferencias entre los mutantes y el control *Col-7* en el contenido de K^+ (***par1-ID* > *Col-7* > *par1-2***). Con respecto al Na^+ , se observa un mayor contenido en el mutante *par1-2* y una menor acumulación en el mutante *par1-ID*, respecto al control *Col-7* (Figura 4.25.A).

Cuando se riegan las plantas con solución nutritiva suplementada con 10 mM de LiCl, se observa una disminución general en el contenido de K^+ . El mutante *par1-2* presenta, en estas condiciones, un menor contenido de K^+ en comparación con el control *Col-7*, no habiendo diferencia en el caso del mutante *par1-ID* (Figura 4.25.B). Con respecto al Li^+ , se detecta un mayor contenido en el mutante *par1-2* y una menor acumulación en el mutante *par1-ID*, respecto al control *Col-7* (Figura 4.25.B).

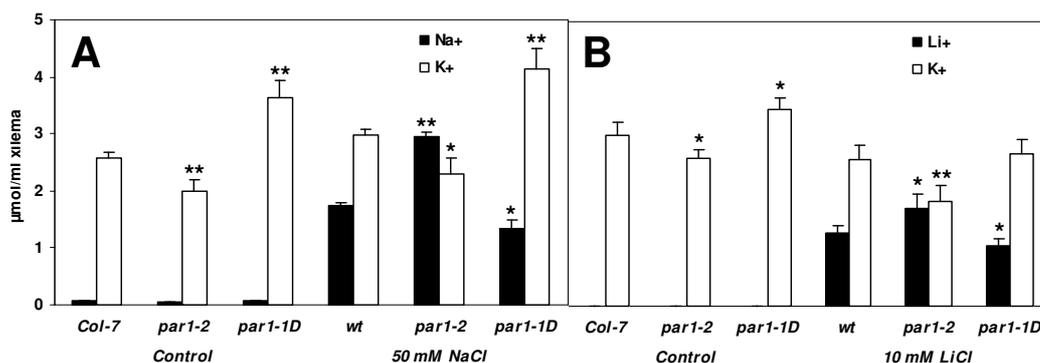


Figura 4.25 Contenido de cationes en el xilema de plantas irrigadas con NaCl (A) y LiCl (B) en el control silvestre (*Col-7*) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del locus *At1g15020*. La figura muestra el contenido de Na^+/K^+ y Li^+/K^+ en el xilema de plantas irrigadas con 50 mM NaCl o 10 mM LiCl durante 3 y 2 días, respectivamente. Las plantas control fueron irrigadas con solución nutritiva. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno ($n=6$). * y ** indican que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y los alelos mutantes, con un nivel de confianza de 99,5 y 99,9 % respectivamente, mediante una prueba t de Student.

Estos resultados confirman la hipótesis de que los alelos *par1* están afectados en la carga de cationes en el xilema, presentando el mutante *par1-1D* un aumento en la carga de K^+ y una disminución en la carga de Na^+ y Li^+ , mientras que el mutante *par1-2*, al contrario, muestra una disminución en la carga de K^+ y un aumento de la carga en Na^+ y Li^+ en el xilema.

4.4 La sobreexpresión del locus *At1g15020* reproduce el fenotipo del mutante *par1-1D*

Para demostrar que la sobreexpresión del locus *At1g15020* en el mutante *par1-1D* produce los mismos fenotipos de resistencia a cationes tóxicos, se procedió a la transformación de plantas de *A. thaliana* con el cDNA del locus *At1g15020* bajo el control del promotor constitutivo 35S en el plásmido binario pBI121 (ver apartado 3.1.6). Posteriormente se analizó mediante “Northern Blot” el nivel de expresión del gen correspondiente al locus *At1g15020* de 11 líneas transgénicas y se seleccionaron 2 líneas independientes que mostraban una fuerte expresión de dicho gen (Figura 4.26).

En las pruebas de tolerancia a cationes tóxicos en medio MS sólido se observa que las líneas 2 y 10 presentan un mayor porcentaje de cotiledones verdes en comparación al control silvestre (Figura 4.27.A). También es posible observar que el tamaño de los cotiledones de la línea 2 es mayor que el control silvestre y similar al mutante con ganancia de función (*par1-1D*) (Figura 4.27.B).

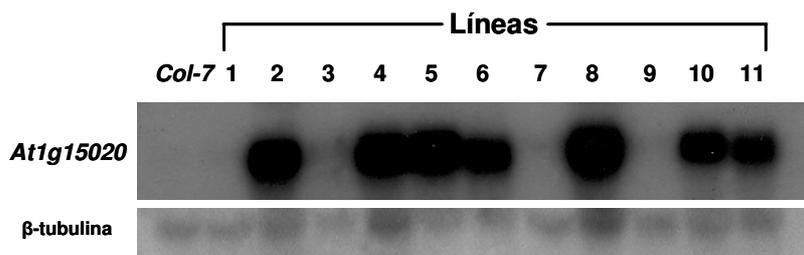


Figura 4.26 “Northern Blot” de 11 líneas transgénicas independientes. La membrana contiene 20 μ g de RNA por muestra que fue hibridada con una sonda específica para el locus *At1g15020*. El control de carga de RNA fue determinado mediante la hibridación con una sonda específica para el gen de la β -tubulina. Control silvestre (*Col-7*).

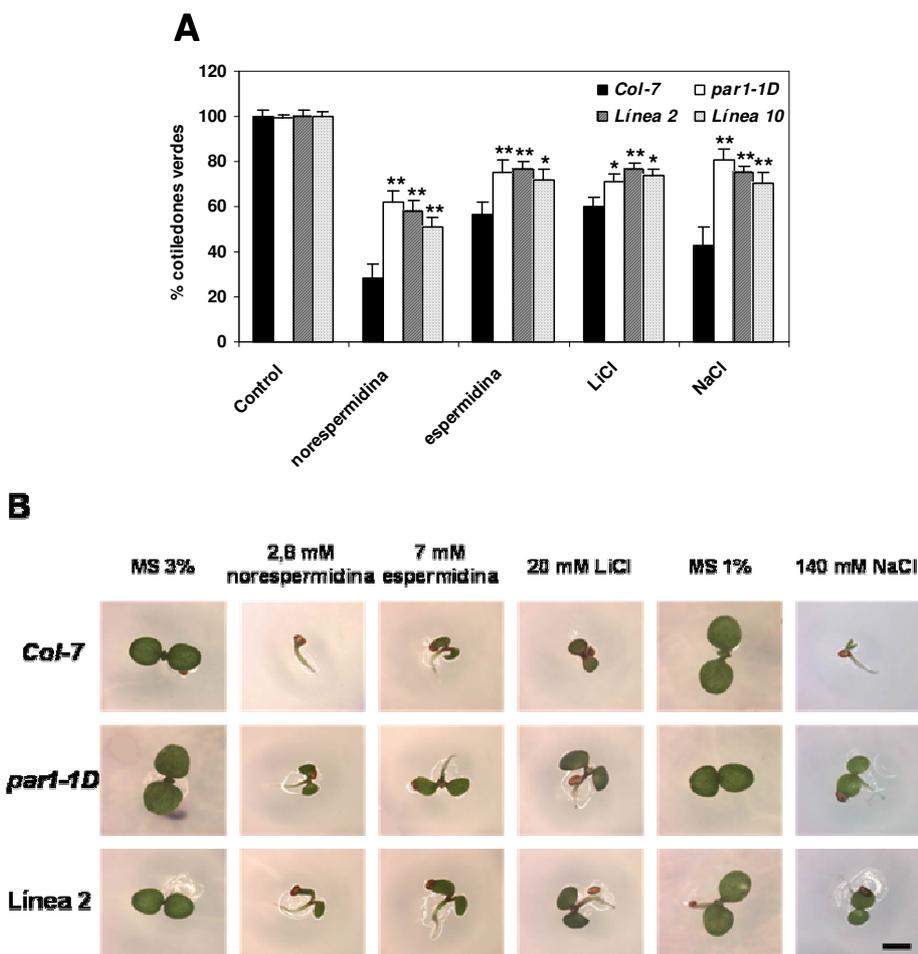


Figura 4.27 A) Porcentaje de cotiliones verdes en el mutante *par1-1D* y en las líneas transgénicas 2 y 10 en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa suplementados con 2,8 mM noespermidina, 7 mM espermidina, 20 mM LiCl y en MS 1% sacarosa suplementado con 140 mM NaCl. Los datos fueron tomados a los 6 días. Control representa el % de cotiliones verdes presentes en medio MS con 1 y 3% de sacarosa. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes ($n=3$). * y ** indican que existen diferencias significativas, entre el control silvestre (*Col-7*) y las demás líneas, con un nivel de confianza de 99,5 y 99,9 % respectivamente, mediante una prueba t de Student. B) Fenotipo del mutante *par1-1D* y la línea transgénica 2 en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos. Las fotos fueron tomadas después de 6 días y muestran una plántula representativa del fenotipo. La escala corresponde a 2 mm.

No se observaron diferencias de germinación o morfológicas entre plantas control y plantas transgénicas en medio MS sólido o en condiciones de invernadero cuando las plantas eran mantenidas en ausencia de estrés salino. Pero cuando se realizaron pruebas de tolerancia a NaCl y LiCl en condiciones de invernadero se observaron importantes diferencias tanto en el estado de la roseta como en el extremo de los tallos. Por un lado, las plantas control presentan un mayor deterioro y marchitamiento en las hojas de la roseta comparado con la línea transgénica en medios irrigados con NaCl y LiCl (Figura 4.28.A y 4.28.B); y por otro lado, el ápice de los tallos en las plantas control presentan un avanzado estado de marchitamiento, mientras las plantas transgénicas no presentan ningún síntoma en medio con LiCl (Figura 4.28.C).

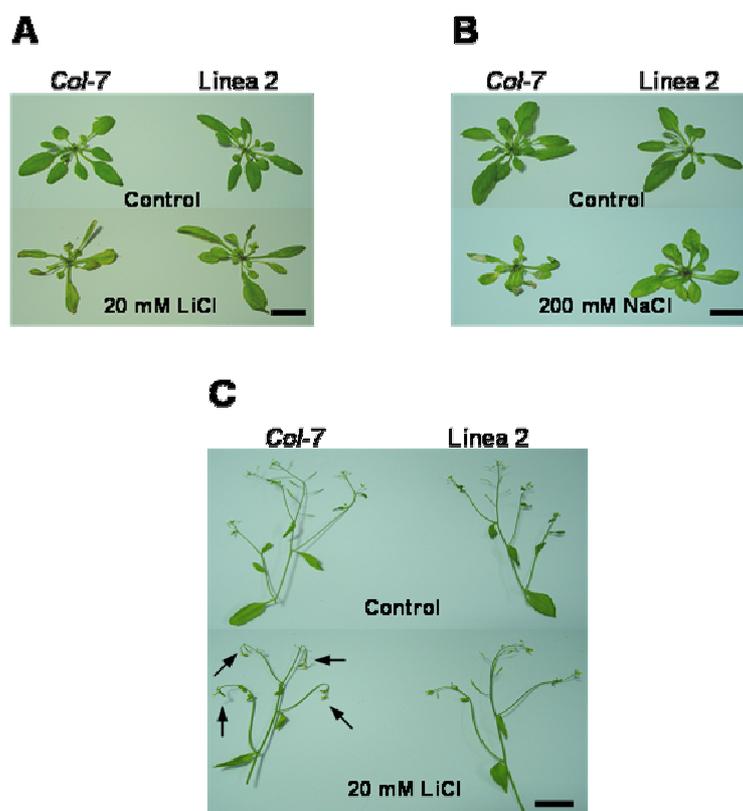


Figura 4.28 A) Fenotipo de la roseta de la línea 2 después de un estrés salino con LiCl. Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 20 mM de LiCl durante 8 días. La escala corresponde a 2 cm. **B) Fenotipo de la roseta de la línea 2 después de un estrés salino con NaCl.** Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 200 mM de NaCl durante 11 días. La escala corresponde a 2 cm. **C) Fenotipo de la parte aérea en la línea 2 después de un estrés salino con LiCl.** Las plantas fueron irrigadas con solución nutritiva suplementada con 20 mM de LiCl durante 7 días. Las flechas indican los ápices florales marchitos. La escala corresponde a 4 cm. Control indica que las plantas fueron irrigadas solo con solución nutritiva. Control silvestre (*Col-7*).

También se midió la cantidad de K^+/Na^+ y K^+/Li^+ en la parte aérea de plantas sometidas a estrés por NaCl y LiCl respectivamente. En la figura 4.29.A se observa que en ausencia de NaCl, la cantidad de Na^+ en el control (*Col-7*) y la línea transgénica es muy similar, pero en presencia de NaCl la cantidad de Na^+ en la línea transgénica es menor que en el control. En el caso del K^+ , en ausencia y presencia de NaCl su contenido es mayor en la línea transgénica comparada con el control (Figura 4.29.A).

Al regar las plantas con solución nutritiva suplementada con 15 mM de LiCl, la acumulación de este catión en la parte aérea es ligeramente mayor en el control *Col-7* que en la línea transgénica (Figura 4.29.B). Por otro lado, la línea transgénica acumula más K^+ que el control *Col-7*, tanto en ausencia como en presencia de LiCl, pero en ambos tiene lugar una disminución en la cantidad de K^+ como consecuencia de la irrigación con LiCl (Figura 4.29.B).

Finalmente en la figura 4.29 se observa que los valores de acumulación de cationes de la línea transgénica sobreexpresando el *locus* At1g15020 son similares a los del mutante *par1-1D*, utilizado como control positivo en estos experimentos.

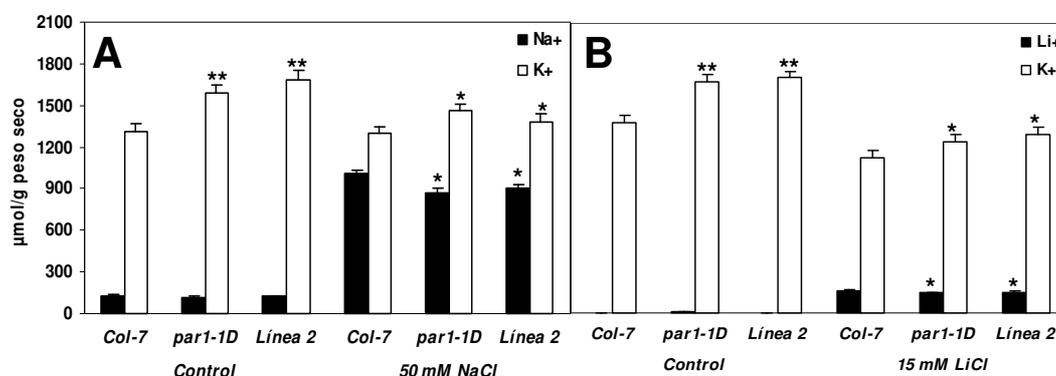


Figura 4.29 Contenido de cationes en la parte aérea de plantas irrigadas con NaCl (A) y LiCl (B) en el control silvestre (*Col-7*), en el mutante con ganancia (*par1-1D*) de función del *locus* At1g15020 y en la línea 2 que sobreexpresa el *locus* At1g15020. El contenido de Na^+/K^+ y Li^+/K^+ en la parte aérea fue medido de plantas irrigadas con 50 mM NaCl o 15 mM LiCl durante 5 y 3 días, respectivamente. Las plantas control fueron irrigadas con solución nutritiva. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno ($n=6$). * y ** indican que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y las demás líneas mutantes, con un nivel de confianza de 99,5 y 99,9 % respectivamente, mediante una prueba t de Student.

4.5 Análisis bioinformático del *locus* At1g15020

4.5.1 Predicciones informáticas

El *locus* At1g15020 está anotado en la base de datos *TAIR* (<http://www.arabidopsis.org>) con el nombre *AtQSOX1* (Quiescin Sulfhydryl Oxidase). Esta proteína pertenece a la familia de las quiescina sulfidril oxidasas (QSOX), proteínas dependientes de FAD que usan oxígeno molecular para formar enlaces disulfuro generando peróxido de hidrógeno (Hoover *et al.*, 1999a). Las proteínas QSOX están posiblemente involucradas en la formación de la matriz extracelular y en la regulación redox de las actividades enzimáticas (Hoover y Thorpe, 1999, Coppock *et al.*, 2000). Estas proteínas poseen un dominio tiorredoxina (TRX), que permite la reducción de enlaces disulfuro, (Malkin y Niyogi, 2000) y un dominio ERV1/ALR, que presenta actividad sulfidril oxidasa (Lee *et al.*, 2000).

Para el análisis de los dominios que conforman la proteína se utilizó el programa *InterProScan* (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). El análisis de la secuencia de aminoácidos (Figura 4.30) revela un péptido señal en la región N-terminal de aproximadamente 33 aminoácidos, que predice una localización en la vía de secreción. A continuación se encuentra un dominio de tiorredoxina (TRX) que contiene un motivo WCPAC (la secuencia consenso de la familia QSOX es **wCgx⁴C**). Este motivo se considera muy importante para la función de las proteínas QSOX (Raje y Thorpe, 2003). También está presente el dominio ERV/ALR en la región C-terminal. En este segundo dominio se encuentra el motivo primario FFMCDDCRRHF (la secuencia consenso en la familia QSOX es **ffxCxdCxxhF**) que participa en la oxidación de grupos disulfuro y el motivo HNKVNRL (secuencia consenso **HNxVNxrl**) que interactúa con la región ADP del cofactor FAD (Gross *et al.*, 2002). Finalmente, presenta el motivo QLCPSC (secuencia consenso **eLCxxC**) que solo está presente en la familia QSOX pero no en la familia ERV1/ALR. Se ha demostrado que existe una interacción entre el motivo primario y este segundo par de cisteínas, lo cual es una característica importante de las sulfidril oxidasas (Raje y Thorpe, 2003).

⁴ Las letras en mayúsculas indican que el aminoácido está conservado, las letras en minúscula indican que el aminoácido es el mayoritario en la secuencia consenso y la letra x indica que puede ser cualquier aminoácido.

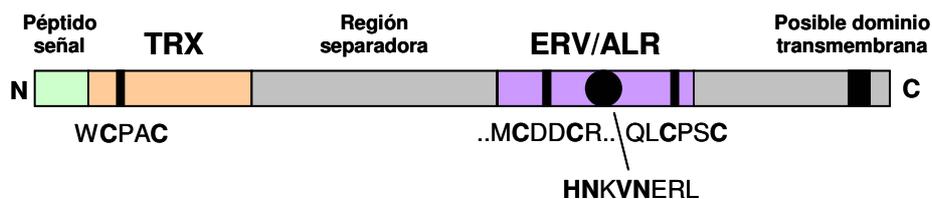


Figura 4.30 Esquema de la proteína codificada por el locus *At1g15020* donde se muestran los dominios y motivos característicos de las proteínas de la familia QSOX. En verde se muestra el péptido señal, en naranja se muestra el dominio tioredoxina (TRX) con un motivo redox, en morado se muestra el motivo ERV1/ALR con 2 motivos redox y el círculo negro corresponde al sitio de unión de FAD. Finalmente el rectángulo negro representa un posible dominio transmembrana. En los diferentes motivos se resalta en negro los aminoácidos de la secuencia consenso presentes en todos los individuos de la familia QSOX. N y C indican el extremo N-terminal y C-terminal, respectivamente.

Posteriormente, mediante el programa *PROSITE* (<http://www.expasy.org/prosite/>) se encontró que la proteína presenta un posible sitio de miristoilación, 3 sitios de N-glicosilación y ausencia de señal de retención de retículo endoplasmático (KDEL). La miristoilación es la unión de una proteína a la membrana plasmática por medio de un enlace amida entre el grupo amino de una glicina y el ácido mirístico (Alberts *et al.*, 2002). La N-glicosilación es la incorporación de polisacáridos en una proteína llevada a cabo en el aparato de Golgi para formar glicoproteínas (Staehelin y Newcomb, 2000).

Empleando la base de datos TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/index.shtml>) se averiguó que el gen *At1g15020* presenta 2 isoformas: *At1g15020.1* y *At1g15020.2*, que comparten exactamente los mismos exones a excepción del último (exón 11) donde la isoforma *At1g15020.1* carece de una porción (Figura 4.31). Finalmente, aplicando el análisis de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) se encontró que las 2 isoformas mantienen la posible región transmembrana en la región C-terminal (Figura 4.32).

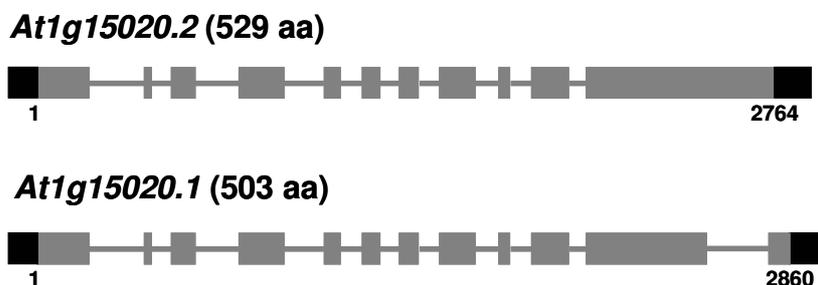


Figura 4.31 Representación esquemática de los intrones y exones de las 2 isoformas del gen *At1g15020*. Los exones son representados como rectángulos de color gris y los intrones como líneas de color gris. Los rectángulos de color negro representan las regiones UTR (regiones no traducidas). Se indica el sitio del codón ATG (1) y el sitio del codón de parada (2764/2860). Aminoácidos (aa).

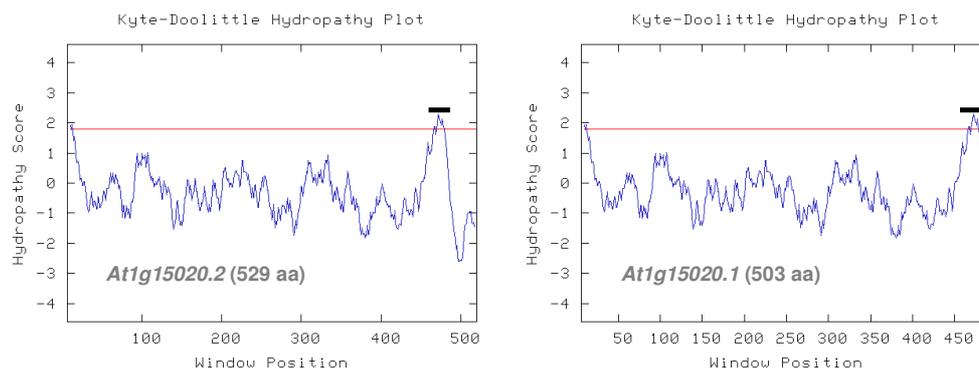


Figura 4.32 Análisis de hidrofobicidad de las 2 isoformas del gen *At1g15020*. La línea roja representa el valor mínimo de hidrofobicidad (1,8) para considerar una región como posible dominio transmembrana. La línea negra señala el posible dominio transmembrana en ambas isoformas.

4.5.2 Análisis proteico de la familia QSOX en *Arabidopsis*

Usando la base de datos de proteínas UniProt, presente en el programa BLAST (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>), se buscaron proteínas con homología a AtQSOX y se encontró una proteína de *A. thaliana* con un alto grado de homología (76% de identidad) que ya había sido descrita previamente (Thorpe *et al.*, 2002), además de 3 proteínas de *M. trunculata*, arroz (*O. sativa*) y maíz (*Z. mays*) con un grado de homología medio a AtQSOX de 63%, 55% y 54%, respectivamente. Estas 4 proteínas poseen todos los dominios estructurales y motivos descritos para ATQSOX (Figura 4.33) y también unos parámetros teóricos similares en lo referente a número de aminoácidos, masa molecular, probables dominios transmembrana y localización subcelular (Tabla VI).

Tabla VI. Parámetros obtenidos mediante los programas PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) y Compute pI/Mw (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) de 5 miembros de la familia QSOX de plantas. *M. trunculata* (MtrDRAFT_AC144731g6v1), arroz (OSJNBa0079H23.16) y maíz (TEL1). kilodaltons (kDa)

	Aminoácidos (aa)	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pI)	Dominios transmembrana	Localización subcelular
AtQSO2.2/AtQSO2.1	529/503	60/57	7,8/8	1/1	Membrana plasmática
AtQSO1	495	56	8,5	1	Membrana plasmática
MtrDRAFT_AC144731g6v1	517	58,4	6,8	1	Membrana plasmática
OSJNBa0079H23.16	513	57,8	8,4	1	Membrana plasmática
TEL1	511	57	7	1	Membrana plasmática

	Péptido señal	
At1g15020	---MSLIHLFLLLGLLSLEAAASFSPGS----RSILRDIGSN---VADQK	40
At2g01270	---MSLVHLLLFAGLV--IAASSSSPGS----RLILREIS-----DQK	34
MtrDRAFT_AC144731g6v1	---MNLlyFALFLCTISVSSSATSSSSSSFPGRSILREVHDNDQTGTDDH	47
OSJNBa0079H23.16	-MAAAVARVVVVLVLAASLAAPRG----AAARSLGGREGPGEVDA	44
TEL1	MAASTAAARRLLALAVLAACLGSAPHG----AVALRSLGVGGAADG	45
	:. . . . I . . .	
At1g15020	DNAIELNATNFDVSFVQDSPAKEYAVLEFFAHWCPACRNYKPHYEKVARLFN	90
At2g01270	DKAVELNNTNFDSVLKDTPAKYAVVEFFAHWCPACRNYKPHYEKVARLFN	84
MtrDRAFT_AC144731g6v1	DYAVELNATNFDVAVLKDTPATFVVEFFAHWCPACRNYKPHYEKVAKLFN	97
OSJNBa0079H23.16	DAAVDLNATNFDAFLKASLEPWAVVEFFAHWCPACRNYKPHYEKVAKLFN	94
TEL1	DAAVDLASNFTAFLOTSPESPFAVVEFFAHWCPACRNYKPHYERVAKLFN	95
	* * : * : : * * . : : : . : * : * * * : * * * * * * * * : * * * * *	
At1g15020	GADAVYPGVLMTRVDCAKMNVKLCDFKFSINHYPMLFWAPPKRFVGGSW	140
At2g01270	GPDAIHPGIVLMTRVDCAMKNTNKLCKDFSVSHYPMLFWGPPKTFVGGSW	134
MtrDRAFT_AC144731g6v1	GPDAVHPGIILLTRVDCASKINIKLCKDFSVGHYPMLFWGPPPKFVGGSW	147
OSJNBa0079H23.16	GRDAAHPGLILMARVDCASKVNIIDLNRFSVDHYPFLWGPPTKFASAKW	144
TEL1	GPDAHPGTVMARVDCASKVNVVDCNKFSVDHYPYLWGPPTKFNLAQW	145
	* * * : * * . : : : * * * * * * * * . * * * : * * * * * * * * * * * * * *	
At1g15020	GPKQEKNEISVWNEWRTADLLLNWINKQIGSSYGLDDQKLG--NLLSN-I	187
At2g01270	EPKDKKSEILVIDDGRTAERLLNWINWINKQIGSSYGLDDQKFNEHALSN-L	183
MtrDRAFT_AC144731g6v1	EPKQEKSDIHVIDDARTADRLLNWINWINKQSSSFLDDQKFQNEHLSN-V	196
OSJNBa0079H23.16	DPKQENNEIKLIDDGRTAERLLKWINWINKQSSSFLDDQKQENHLSN-V	194
TEL1	KPKQENSELELIDDGRTADRLLKWINWINKQSSSFLDDQKQENHLSN-V	195
	* * : : : . : : : * * : * * * * : : : * * : * * * * : . .	
At1g15020	SDQEIQSQAIFDIEEATEEAFDII LAHKAIKSSETSASFI RFLQLLVAHH	237
At2g01270	TDYNIQISQAVYDVEEATAEAFDII LAHKAIKSSETSASFI RFIQLLAAHH	233
MtrDRAFT_AC144731g6v1	SDPEQIARAIYDVEEATSLAFDII LENKMIKP-ETRASLVKFLQVLTAAH	245
OSJNBa0079H23.16	SDPEQIVQAIYDVEEATAQALQII ILERKTIKP-KNRDSLIRLFLQILVARH	243
TEL1	SDPEQIVRAIYDVEEATSHALQII LEHKMIKP-DTRDSLISFLQILVAHH	244
	: * * * : * * : *	
At1g15020	PSRRRCRTGSAEILVNFDICPSGE-CSYDQESGAKDSLRFNH--ICGKDV	284
At2g01270	LSRRCRKGAEILVNVDLCPSPGN-CSYEK-SGGNDTLGNFP--ICGKDV	279
MtrDRAFT_AC144731g6v1	PSRRRCRKGADLLVSVFADLYPTDF-WSSHKQEDDKSSVKNFQ--ICGKEV	292
OSJNBa0079H23.16	PSKRCRGSAEILNFDHWSNLSLSSQEGSKLLESVAEENHWICGKEV	293
TEL1	PSKRCRGSAEILLDFDDHWHNTNLSLSESDSTLLKGAGEK--VCGNGV	291
	* : * * * * * . : : : * * . : . : . : . : . : * * * : *	
At1g15020	PRGYRFCRGSKNETRGFSCGLWVLMHLSVRIEDGESQFAFTAICDFIN	334
At2g01270	PRGYMFRCRGSKNDRTRGFSCGLWVLMHLSVRIEDGESHFATTCDFVN	329
MtrDRAFT_AC144731g6v1	PRGYWMFCRGSKNETRGFSCGLWVLLHLSVRIEDGESQFTFNAICDFVH	342
OSJNBa0079H23.16	PRGYWLFRCRGSKSETRGFSCGLWVLMHLSLTVRIGDGESQSTFTSICDFIH	343
TEL1	PRGYWIFRCRGSKSETRGFSCGLWVLLHLSLTVRIGDGESQSTFTSICDFIH	341
	* * * * : * * * * * : *	
	II III	
At1g15020	NFFMCDCCRHFHDMCLSVKTPFKKARDIALWLWSTHNKVNERLKKDEDS	384
At2g01270	NFFMCDDECLHFNDMCLSVKTPFKKARDFVLWVWSTHNKVNERLLKDEAS	379
MtrDRAFT_AC144731g6v1	NFFVCECRQHFYDMCSSVSTPFNKARDFVLWVWSSHNKVNERLSKEEAS	392
OSJNBa0079H23.16	NFFICECRKHFYEMCSSVSAFPRTARELSLWVWSTHNKVNMRLMKEEKD	393
TEL1	NFFICECRTHFYEMCSSVSVFPKSARDLALWVWSTHNKVNERLMKEEKD	391
	* * * : *	
	IV	
At1g15020	LGTGDPKFPKMIWPPKQLCPSCYLSSTEKN----IDWDHDQVYKFLKY	429
At2g01270	LGTGDPKFPKIWPPKELCPLCYLSSNQKS----IEWDHEHVYKFLKNY	424
MtrDRAFT_AC144731g6v1	LGTGDPKFPKTIWPTKQLCPLCYLGHQKSNK---IEWNQDEVYKALKNY	439
OSJNBa0079H23.16	MGTGDPPLFPKVTWPPNQLCPSCYRYS--KVTDG--AVDWNEAVYQFLVNY	440
TEL1	LDNADPSFPKIWPPKQLCPLCYRYSRTADGAMQVENEDEVFNFLVNY	441
	: . . . * * * * * * * * * * * * . . . : : : * * : * * *	
	Dominio transmembrana	
At1g15020	YGQKLVSVYKNGESVSKKEEVIAAAEEMAVPTNALVVPVGAALAIALASC	479
At2g01270	YGPKLVSlyKEKSVSRSKETVSATEDLTVATNALVVPVGAALAIALASC	474
MtrDRAFT_AC144731g6v1	YEKTLVSLYKEKDIAAGNDGTGAALEDLIVGTNAVVPVGAALAIAVASC	489
OSJNBa0079H23.16	YGKLVSSYKETYMESLQQQEKKIVSEDSISNAASVPIGAALGVAIASC	490
TEL1	YGKMLVSSYRETSMQSFQVAS---ISDSSASSAATVPIGAALGVAIASC	488
	* * * * * : : . : * * * * * : * * * * * * * * * *	
At1g15020	AFGALACYWRTOQKNRKYNYNPHYLKRYNSNYMVMNTFSNTESEREKER	528
At2g01270	AFGALACYWRTOQKNRKRPRR-----	495
MtrDRAFT_AC144731g6v1	AFGALACYWRSSQKSRKYFHHLSLKNI-----	517
OSJNBa0079H23.16	TFGALACFWRAQKQNRKQRKNWN-----	513
TEL1	TFGALACFWRTQKQNRKQRKNWN-----	511
	: * * * * * : * * * * * * * * * * * * .	

Figura 4.33 Alineamiento de las proteínas QSOX de plantas. El asterisco indica los aminoácidos idénticos para las 5 proteínas, los dos puntos indican las sustituciones de aminoácidos equivalentes y el punto indica la presencia de aminoácidos con características similares. En azul se muestra el péptido señal y el posible dominio transmembrana. En rojo se muestra la secuencia consenso de los diferentes motivos. Los motivos I, II y IV son los motivos redox que presentan 2 cisteínas separadas por 2 aminoácidos. El motivo III representa el sitio de unión a FAD. *M. trunculata* (MtrDRAFT_AC144731g6v1), *O. sativa* (OSJNBa0079H23.16) y *Z. mays* (TEL1).

La proteína de *Arabidopsis* homóloga a AtQSOX, que corresponde al locus At2g01270, posee la misma estructura de exones e intrones que la isoforma At1g15020.1. Debido a la existencia de 2 proteínas homólogas en *Arabidopsis* de la familia QSOX, se propuso el nombre de *AtQSO1* para el locus At2g01270 y *AtQSO2* para el locus At1g15020 usando solo 3 letras itálicas conforme a lo establecido en la comunidad genética de *Arabidopsis* (Meinke y Koornneef, 1997), ya que anteriormente se había nombrado al locus At2g01270 como AtQSOX1 y al locus At1g15020 como AtQSOX2 (Thorpe *et al.*, 2002).

4.6 Aislamiento y caracterización fenotípica de mutantes en el gen *AtQSO1*

Debido a que la disminución o pérdida de expresión de uno de los miembros de la familia QSOX de *Arabidopsis* (*AtQSO2*) produce un fenotipo de sensibilidad a cationes tóxicos (Figuras 4.15 y 4.16), se determinó si la pérdida de función del otro miembro de la familia (*AtQSO1*) produciría también un fenotipo similar o por el contrario, el fenotipo es específico para los mutantes del gen *AtQSO2*.

4.6.1 Identificación de líneas mutantes del gen *AtQSO1*

Para la obtención de líneas homocigotas con inserciones de T-DNA en el gen *AtQSO1* se utilizó la base de datos SIGnAL, donde se identificaron 2 líneas SALK segregantes (Figura 4.34), a partir de las cuales se realizó el aislamiento de las líneas homocigotas para las inserciones de T-DNA, mediante PCR diagnóstica, como se explica en el apartado 3.16.3.

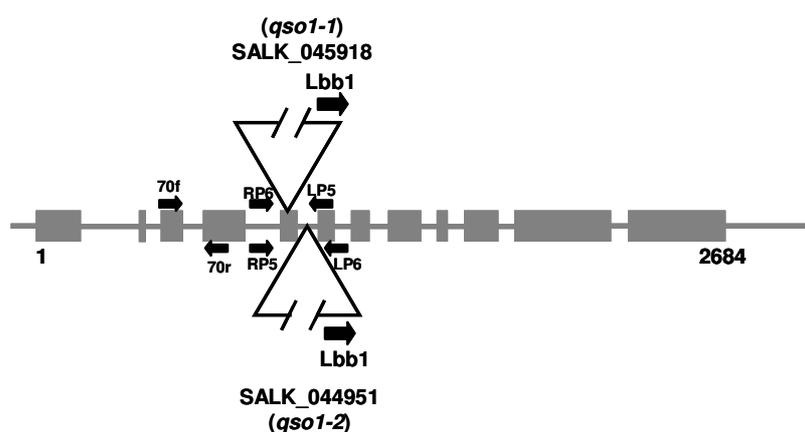


Figura 4.34 Posición relativa de las inserciones de T-DNA en el locus At2g01270. Los triángulos indican la posición del T-DNA en el gen identificadas de la base de datos SIGnAL. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos utilizados para la PCR diagnóstica (LP/RP) y RT-PCR cuantitativa (70f/70r).

4.6.2 La mutación del gen *AtQSO1* presenta diferentes grados de sensibilidad a cationes tóxicos

Una vez aisladas las líneas homocigotas SALK_045918 (*qso1-1*) y SALK_044951 (*qso1-2*), se realizó un análisis de RT-PCR cuantitativa observándose que los mutantes *qso1-1* y *qso1-2* expresan el gen *AtQSO1* aproximadamente 10 y 16 veces menos que el control, respectivamente (Figura 4.35).

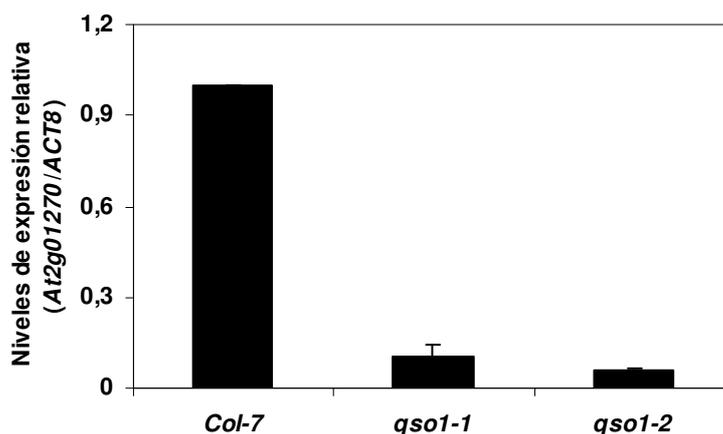


Figura 4.35 Expresión del gen *AtQSO1* en los alelos mutantes mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión del locus At2g01270 se indican en función de la expresión en el control silvestre (valor de 1). Las barras de error representan la desviación estándar de 3 muestras independientes. Los valores de expresión fueron normalizados utilizando los valores de C_T del gen *ACT8*.

A continuación se procedió a la caracterización fenotípica de los mutantes mediante ensayos de germinación en medio MS con diferentes cationes a concentraciones tóxicas y tomando el peso fresco de las plántulas en las condiciones anteriores. Las 2 líneas mutantes presentan un fenotipo similar al control en norespermidina, espermidina y LiCl (Figura 4.36.A), aunque en medio con NaCl el mutante *qso1-2* presenta un menor número de plántulas con cotiledones verdes en comparación con el control. En el análisis de peso fresco, el mutante *qso1-1* no presenta ninguna diferencia en el peso respecto al control en los diferentes medios empleados, pero el peso fresco del mutante *qso1-2* es menor que el del control en medio con NaCl (Figura 4.36.B).

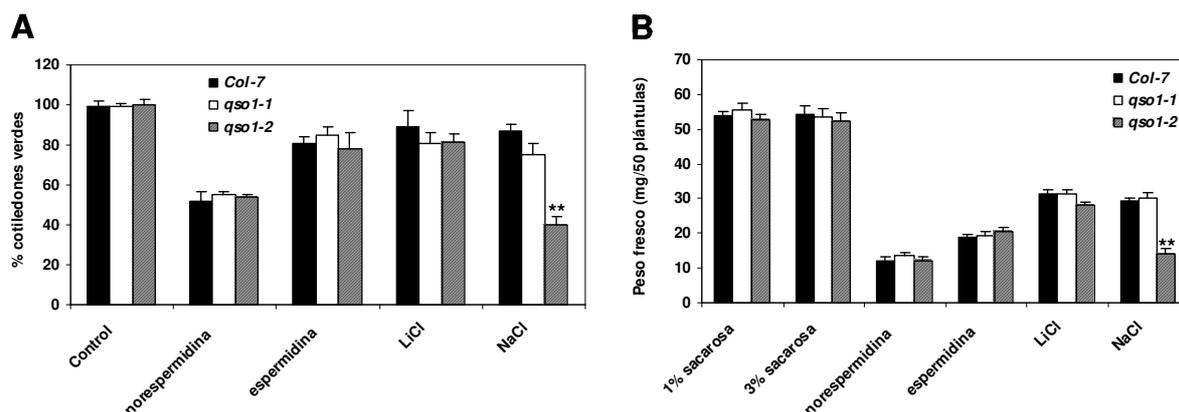


Figura 4.36 Porcentaje de cotiledones verdes (A) y peso fresco (B) en los alelos mutantes del gen *AtQSO1* en medios suplementados con diferentes cationes tóxicas. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa suplementados con 2,4 mM norespermidina, 6 mM espermidina, 18 mM LiCl y en MS 1% sacarosa suplementado con 120 mM NaCl. Control representa el % de cotiledones verdes presentes en medio MS con 1 y 3% de sacarosa. Los datos fueron tomados a los 6 días. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=9). ** indica que existen diferencias significativas, entre *Col-7* y el alelo mutante, con un nivel de confianza de 99,9 %, mediante una prueba t de Student. Control silvestre (*Col-7*).

Como se observa en la figura 4.37, la sensibilidad a NaCl del mutante *qso1-2* está asociada a un menor tamaño y a una cierta inhibición del desarrollo de los cotiledones. En cambio, en el caso de los medios con poliaminas y LiCl, no se observan diferencias apreciables entre los mutantes y el control.



Figura 4.37 Fenotipo de los mutantes *qso1-1* y *qso1-2* en medios suplementados con diferentes cationes tóxicas. Las fotos fueron tomadas después de 6 días y muestran una plántula representativa del fenotipo. La escala corresponde a 2 mm. Control silvestre (*Col-7*).

Los mutantes *qso1-1* y *qso1-2* presentan un desarrollo similar al control silvestre en ausencia de estrés en medio MS (Figura 4.37) y en invernadero (datos no mostrados). Se realizaron pruebas en invernadero con los mutantes *qso1-1*, *qso1-2* y el control silvestre

irrigados con NaCl y LiCl desde el primer día de la siembra. En el caso del Li⁺ no se observan diferencias de germinación y crecimiento (datos no mostrados), aunque sí se detecta claramente en condiciones de estrés por Na⁺ un mayor tamaño de la roseta del control que posee un epicótilo desarrollado a diferencia del mutante *qso1-2* (Figura 4.38). En el caso de plantas adultas sometidas a un estrés de NaCl y LiCl, no se observaron diferencias con el control silvestre y en ensayos de acumulación de cationes, tampoco se observaron diferencia en la acumulación de K⁺ y Na⁺ en comparación con el control silvestre (datos no mostrados).

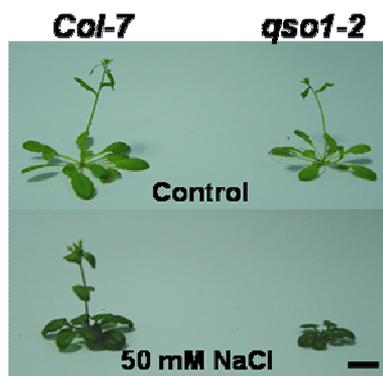


Figura 4.38 Crecimiento del mutante *qso1-2* en condiciones de estrés por NaCl. Las macetas fueron irrigadas 2 veces por semana con solución nutritiva (Control) y solución nutritiva suplementada con 50 mM NaCl. Las fotos fueron tomadas después de 25 días. La escala corresponde a 2 cm. Control silvestre (*Col-7*).

4.7 Análisis de la expresión de los genes *AtQSO1* y *AtQSO2*

4.7.1 Expresión de los genes *AtQSO1* y *AtQSO2* en diferentes tejidos

Para determinar el patrón de expresión de los genes de la familia QSOX de *A. thaliana* se realizó una RT-PCR cuantitativa de las diferentes partes de la planta (flor, hoja caulinar, hoja adulta, raíz y tallo floral) usando un par de cebadores específicos para cada gen (Anexo 1). Se puede observar en la figura 4.39 que tanto *AtQSO1* como *AtQSO2* presentan un nivel muy bajo de expresión en todos los tejidos, a excepción de la raíz, que presenta un nivel alto de expresión.

Utilizando la base de datos de expresión de genes *GENEVESTIGATOR* (<https://www.genevestigator.ethz.ch/at/index.php>) se observa que la expresión del gen *AtQSO1* es similar en raíces, tallos y hojas adultas, siendo un poco mayor en hojas caulinares y menor en flores, pero la expresión del gen *AtQSO2* es similar en flores, tallos hojas caulinares y adultas siendo solo mayor en raíces (Figura 4.40).

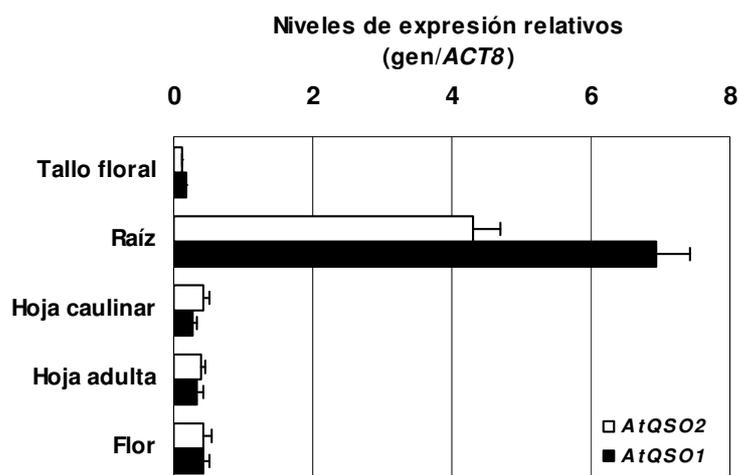


Figura 4.39 Expresión de los genes de la familia QSOX en diferentes partes de planta adulta mediante RT-PCR cuantitativa. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 muestras independientes. Los valores de expresión fueron normalizados utilizando los valores de C_T del gen *ACT8* (actina).

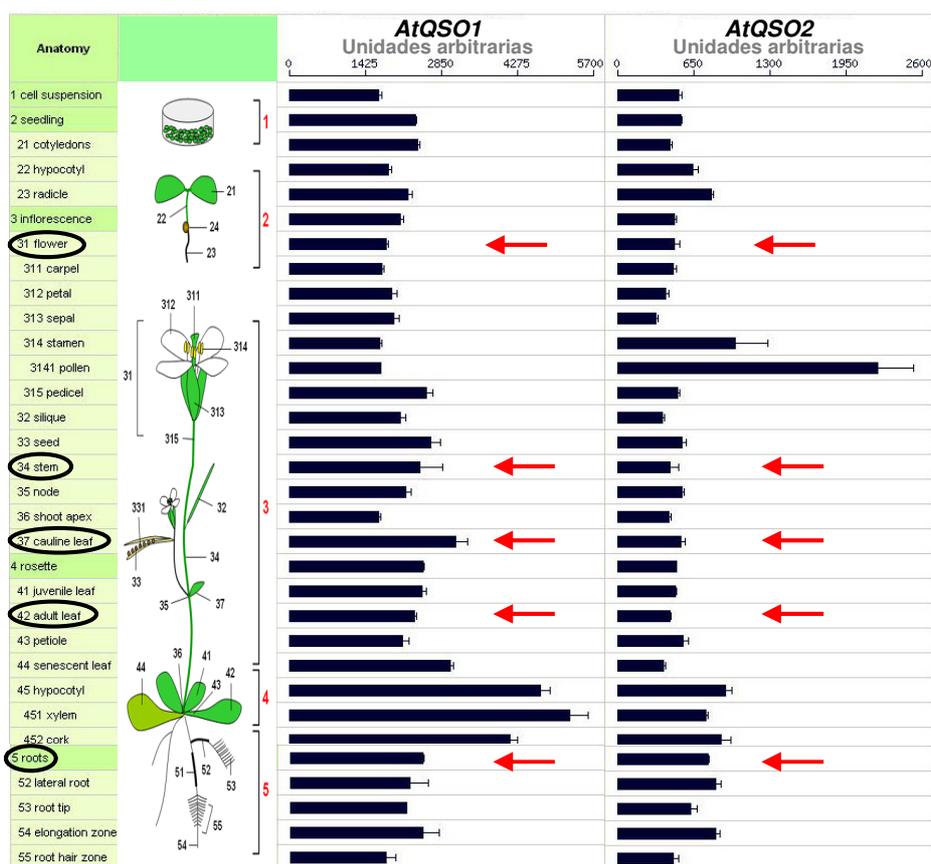


Figura 4.40 Niveles de expresión de los miembros de la familia QSOX en diferentes tejidos. Los valores de expresión se obtuvieron a través de la base de datos *GENEVESTIGATOR* (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) utilizando los resultados provenientes de los arrays ATH1 GeneChip® de 22k. Los datos experimentales proceden de diversas fuentes como son AtGenExpress, NASCarrays, GEO, ArraysExpress, Gruissem laboratory, TAIR y Functional Genomics Center Zurich. Los círculos negros indican los tejidos empleados en el análisis de RT-PCR cuantitativa. Las flechas en rojo indican los valores de expresión de los tejidos seleccionados para los genes *AtQSO1* y *AtQSO2* en unidades arbitrarias

4.7.2 Expresión de los genes *AtQSO1* y *AtQSO2* en condiciones de estrés

Plantas silvestres fueron sometidas a diferentes tratamientos para determinar el nivel de expresión de los genes *AtQSO1* y *AtQSO2*. Los tratamientos consistieron en someter a las plantas a ABA, peróxido de hidrógeno, manitol, norespermidina y ayuno de potasio durante 4 y 8 horas. Posteriormente se extrajo el RNA y se realizó un análisis “Northern Blot”, llevando como control interno el gen de la β -tubulina. En este experimento no se observaron diferencias en la expresión del gen *AtQSO2* en ningún tratamiento comparado al control sin tratamiento (datos no mostrados).

Posteriormente se realizó un nuevo experimento con plantas silvestres tratadas con ABA, peróxido de hidrógeno, NaCl, LiCl, norespermidina y ayuno de potasio durante 16 horas. El análisis de la expresión de los genes *AtQSO1* y *AtQSO2* se realizó mediante una RT-PCR cuantitativa, los datos se muestran en la figura 4.41.

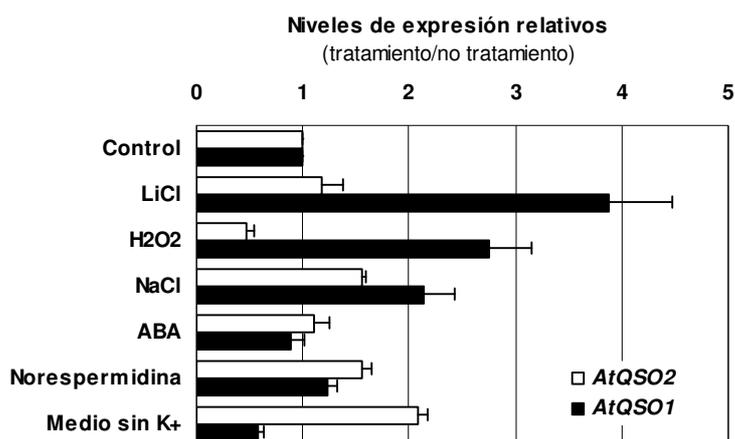


Figura 4.41 Expresión del los genes de la familia QSOX en plántulas sometidas a diferentes tratamientos mediante RT-PCR cuantitativa. Las plántulas fueron tratadas con 25 mM LiCl, 10 mM H₂O₂, 120 mM NaCl, 10 μ M ABA, 2,8 mM norespermidina y medio sin K⁺ durante 16 horas. Los niveles de expresión de los genes *AtQSO1* y *AtQSO2* se expresan en función de la expresión en medio MS sin tratamiento (Control, valor de 1). Las barras de error representan la desviación estándar de 3 muestras independientes. Los valores de expresión fueron normalizados utilizando los valores de C_T del gen *ACT8* (actina).

En los datos de la RT-PCR cuantitativa se observa un incremento de aproximadamente 4, 3 y 2 veces en la cantidad de mRNA del gen *AtQSO1*, respecto al control sin tratamiento, cuando las plantas son tratadas con LiCl, peróxido de hidrógeno y NaCl, respectivamente. También se detecta un incremento de 2 veces en la cantidad de mRNA del gen *AtQSO2* cuando las plantas son sometidas a un ayuno de potasio. Finalmente se observa una disminución de mRNA de los genes *AtQSO1* y *AtQSO2* cuando son sometidos a ayuno de potasio y peróxido de hidrógeno, respectivamente.

Los resultados anteriores se compararon con los datos de expresión obtenidos a través de la base de datos *GENEVESTIGATOR*. Utilizando estos datos se observa que el tratamiento con ABA y peróxido de hidrógeno produce una disminución en la cantidad de mRNA de *AtQSO1* (Figura 4.42), mientras que un tratamiento de estrés oxidativo, estrés osmótico o estrés salino no produce cambios significativos en la expresión de *AtQSO1* (Anexo 2). En el caso de *AtQSO2*, se observa una disminución en la cantidad de mRNA después de un tratamiento con ABA y un aumento de la cantidad de mRNA después de un tratamiento con peróxido de hidrógeno (Figura 4.43), mientras que los estreses oxidativo, osmótico o salino no producen cambios significativos en la expresión de *AtQSO2* (Anexo 3).

Treatment	# of Chips	Mean	Std. Err	265739_at AT268127@ Linear: 5300 2650 0	Ratio	265739_at AT268127@ Linear: 0 2650 5300	Std. Err	Mean	# of Chips	Control	
Chemical: cycloheximide (+)	2	1060	32		0.47			30	2244	2	Chemical: cycloheximide (-)
Hormone: BL /H3BO3 (+)	6	1771	66		0.73			142	2442	2	Hormone: BL /H3BO3 (-)
Hormone: salicylic acid (+)	2	1728	55		0.77			30	2244	2	Hormone: salicylic acid (-)
Nutrient: glucose_2-4-6h	7	1877	53		0.8			76	2346	3	Nutrient: no_glucose/mannitol
Chemical: ibuprofen (+)	2	1817	82		0.81			30	2244	2	Chemical: ibuprofen (-)
Chemical: ozone_1	3	2132	139		0.82			105	2595	3	Chemical: ozone_control_1
Stress: cold_1	12	2236	55		0.82			55	2721	12	Stress: control
Chemical: hydrogen peroxide (+)	3	1528	42		0.83			38	1844	3	Chemical: hydrogen peroxide (-)
Nutrient: Nitrate_low	3	2323	171		0.84			440	2754	3	Nutrient: Nitrate_control
Light quality: blue	6	2703	89		0.84			227	3221	6	Light quality: dark
Chemical: AgNO3 (+)	2	1876	98		0.84			30	2244	2	Chemical: AgNO3 (-)
Chemical: uniconazole (+)	2	1901	3		0.85			30	2244	2	Chemical: uniconazole (-)
Hormone: ABA (+)	4	1688	121		0.85			112	1983	4	Hormone: ABA (-)
Biotic: B. cinerea (+)	6	1884	156		0.86			86	2183	6	Biotic: B. cinerea (-)
Nutrient: S deprivation	6	2664	119		1.16			111	2304	6	Nutrient: S control
Stress: cold_2	3	3174	428		1.33			60	2387	3	Stress: cold_control_2
Chemical: syringolin (+)	3	4847	453		2.03			97	2385	3	Chemical: syringolin (-)

Figura 4.42 Niveles de expresión del gen *AtQSO1* en diferentes tratamientos. Los valores de expresión se obtuvieron a través de la base de datos *GENEVESTIGATOR* (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) utilizando los resultados provenientes de los arrays ATH1 GeneChip® de 22k. Los datos experimentales proceden de diversas fuentes como son AtGenExpress, NASCarrays, GEO, ArraysExpress, Grisse laboratory, TAIR y Functional Genomics Center Zurich. En verde y en rojo se muestran los valores cuyos tratamientos producen una disminución o aumento, respectivamente, en los niveles de expresión de *AtQSO1* en unidades arbitrarias.

La ciclohexamida, el ácido bórico y el ácido salicílico producen la mayor disminución de la cantidad de mRNA de *AtQSO1*, así como la aplicación de siringolina, estrés por frío (cold_2) y el ayuno de azufre producen el mayor aumento de la cantidad de mRNA de *AtQSO1* (Figura 4.42). Con respecto a *AtQSO2*, se observa la mayor disminución de la cantidad de mRNA en plantas sometidas a estrés por frío (cold_1 y cold_3), ciclohexamida y glucosa; además de un ligero aumento en la cantidad de mRNA de *AtQSO2* en plantas tratadas con norfluorazona y *Myzus persicae* (Figura 4.43).

Treatment	# of Chips	Mean	Std-Err	260740_at RT1615020 Linear 1000 500 0	Ratio	260740_at RT1615020 Linear 0 500 1000	Std-Err	Mean	# of Chips	Control
Nutrient: glucose_2-4-6h	7	283	20		0.44		39	637	3	Nutrient: no_glucose/mannitol
Chemical: cycloheximide (+)	2	257	35		0.59		66	438	2	Chemical: cycloheximide (-)
Hormone: ABA (+)	4	375	85		0.68		35	553	4	Hormone: ABA (-)
Stress: cold_3	8	249	37		0.69		19	360	4	Stress: cold_control_3
Stress: cold_1	12	466	55		0.7		57	662	12	Stress: control
Hormone: BL / H3BO3 (+)	6	682	17		0.71		3	955	2	Hormone: BL / H3BO3 (-)
Hormone: GA3 (+)	4	393	37		0.71		35	553	4	Hormone: GA3 (-)
Chemical: AVG (+)	2	313	30		0.71		66	438	2	Chemical: AVG (-)
Biotic: E. cichoracearum (+)	4	360	49		0.72		45	503	4	Biotic: E. cichoracearum (-)
Nutrient: Nitrate_low	3	626	27		0.77		69	815	3	Nutrient: Nitrate_control
Hormone: IAA_1	4	439	28		0.79		35	553	4	Hormone: IAA_control_1
Chemical: brz220 (+)	2	347	17		0.79		66	438	2	Chemical: brz220 (-)
Hormone: MJ (+)	4	446	30		0.81		35	553	4	Hormone: MJ (-)
Chemical: chitin (+)	6	454	28		0.83		14	546	3	Chemical: chitin (-)
Chemical: propiconazole (+)	2	366	20		0.84		66	438	2	Chemical: propiconazole (-)
Chemical: brz91 (+)	2	377	58		0.86		66	438	2	Chemical: brz91 (-)
Chemical: hydrogen peroxide (+)	3	622	44		1.16		136	536	3	Chemical: hydrogen peroxide (-)
Hormone: IAA_2	3	619	61		1.16		80	533	3	Hormone: IAA_control_2
Biotic: P. infestans (+)	6	605	61		1.16		42	523	6	Biotic: P. infestans (-)
Chemical: norflurazon (+)	2	638	43		1.23		13	520	2	Chemical: norflurazon (-)
Biotic: M. persicae (+)	3	688	34		1.24		9	557	3	Biotic: M. persicae (-)

Figura 4.43 Niveles de expresión del gen *AtQSO2* en diferentes tratamientos. Los valores de expresión se obtuvieron a través de la base de datos *GENEVESTIGATOR* (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) utilizando los resultados provenientes de los arrays ATH1 GeneChip® de 22k. Los datos experimentales proceden de diversas fuentes como son AtGenExpress, NASCarrays, GEO, ArraysExpress, Grisse laboratory, TAIR y Functional Genomics Center Zurich. En verde y en rojo se muestran los valores cuyos tratamientos producen una disminución o aumento, respectivamente, en los niveles de expresión de *AtQSO2* en unidades arbitrarias.

Las diferencias existentes entre los valores de expresión de los genes *AtQSO1* y *AtQSO2* en la base de datos *GENEVESTIGATOR* y los resultados obtenidos en esta tesis son posiblemente debido a las diferentes condiciones de los experimentos. Mientras en los experimentos explicados anteriormente se crecieron las plantas en medio líquido durante 10 días para luego ser transplantadas a nuevos medio con las condiciones indicadas durante 16 horas, en los experimentos compilados en la base de datos *GENEVESTIGATOR* las condiciones son más variables y se presentan en el Anexo 4.

4.8 Caracterización funcional de la proteína *AtQSO2*

Una vez determinado que el fenotipo de resistencia a cationes tóxicos del mutante *par1-ID* es debido a la sobreexpresión del gen *AtQSO2*, se procedió a la caracterización de la proteína *AtQSO2*. En primer lugar se estudió la localización celular de *AtQSO2*, que, como se comentó anteriormente, presenta un péptido señal que lo localiza en la vía de secreción celular. Por otro lado, se comprobó la actividad sulfidril oxidasa de la proteína, ya que previamente se determinó, por homología de secuencia proteica, que *AtQSO2* pertenece a la familia de las quiescina sulfidril oxidasas, pero no se había comprobado su actividad

enzimática como tal. Finalmente se procedió a averiguar si AtQSO2 regula o interacciona con el canal de potasio AKT1, con la bomba de protones AHA o con el canal de potasio SKOR, buscando así un posible mecanismo de acción de AtQSO2 en la tolerancia a cationes tóxicos.

4.8.1 La proteína AtQSO2 se ubica en la matriz extracelular

El primer paso consistió en determinar si la proteína AtQSO2 expresada en levaduras es soluble o está asociada a membranas celulares, para lo cual se obtuvo un extracto crudo de proteínas de un cultivo de *S. cerevisiae* sobreexpresando la construcción pCM262QSO2, este extracto fue dividido en fracción soluble (proteínas citoplasmáticas y periplasmáticas) y fracción insoluble (proteínas asociadas a membranas celulares). A continuación las proteínas son separadas según su peso molecular en un gel SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Finalmente se detectó la presencia de la proteína AtQSO2 mediante un análisis “Western Blot” usando un anticuerpo específico para el epítipo HA que esta fusionado al extremo C-terminal de la proteína recombinante AtQSO2. El resultado de este análisis nos indica que la proteína AtQSO2 se ubica únicamente en la fracción soluble, correspondiente a proteínas citoplasmáticas y de la matriz extracelular, de *S. cerevisiae* (Figura 4.44.A). La localización de la proteína AtQSO2 en la fracción soluble y la presencia de un péptido señal para la ruta de secreción nos induce a pensar que es muy probable que la proteína AtQSO2 se ubique en la matriz extracelular de *S. cerevisiae*. Para demostrar esta hipótesis se separaron las proteínas extracelulares (periplasmáticas), que representan el 5% de proteína total e intracelulares (citoplasmáticas y asociadas a membranas celulares), que representan el 95% de proteína total empleando la enzima zimoliasa (esta enzima elimina la pared celular de levaduras permitiendo la liberación de las proteínas ubicadas en el periplasma) y se observó que la intensidad de la banda de AtQSO2 en la fracción extracelular es 8 veces mayor que la fracción intracelular (empleando el programa UVIgelstartMw), por lo que el 30% de la proteína AtQSO2 se ubica en la fracción extracelular (Figura 4.44.B).

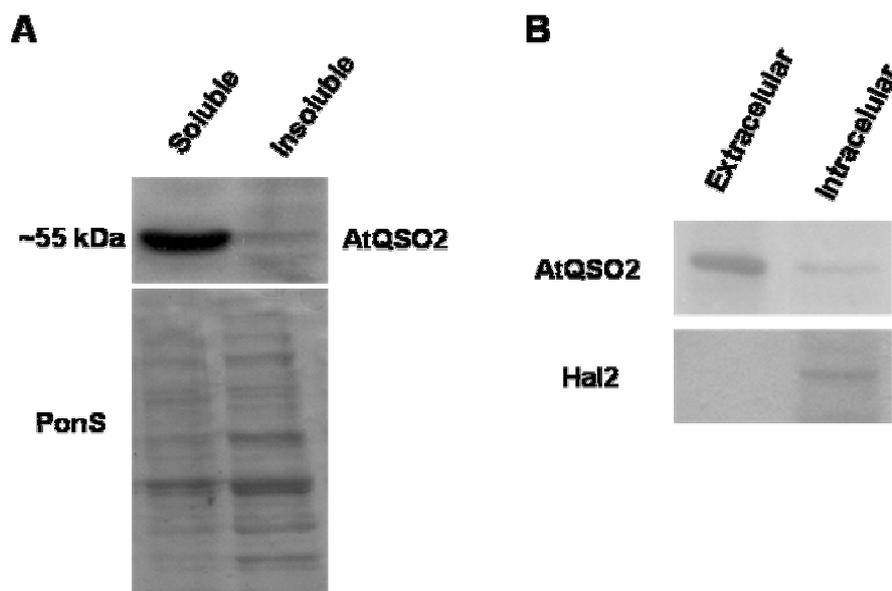


Figura 4.44 “Western Blot” de proteínas de *S. cerevisiae* sobreexpresando el gen *AtQSO2* empleando un anticuerpo anti-HA. **A)** Proteínas solubles (proteínas citoplasmáticas y de la matriz extracelular) e insolubles (proteínas asociadas a membranas celulares). Se cargaron 5 μ g de proteínas solubles y 40 μ g de proteínas insolubles. El control de carga del gel corresponde a la tinción de proteínas totales con el colorante Ponceau (PonS). A la izquierda se muestra el peso molecular en kilodaltons (kDa). **B)** Proteínas extracelulares (matriz extracelular) e intracelulares (citoplasmáticas y asociadas a membranas celulares). Se cargaron 10 μ g de proteínas en cada carril. Se tiene como control de proteína intracelular a Hal2.

Para demostrar la presencia de AtQSO2 en la matriz extracelular de plantas, se realizó la expresión transitoria, bajo el control del promotor 35S, de la proteína AtQSO2 fusionada en el extremo C-terminal a la proteína GFP. Los resultados de la expresión transitoria de AtQSO2 en *N. benthamiana* mostraron que AtQSO2 se ubica en la periferia de las células (Figura 4.45.A), pero no nos permite distinguir claramente si AtQSO2 está ubicado en la membrana plasmática, en la pared celular/matriz extracelular o en ambas. Para ello se llevó a cabo la plasmólisis de las células epiteliales de *N. benthamiana* con manitol, que provoca la contracción de los protoplastos, permitiendo distinguir entre membrana plasmática y pared celular. En estas condiciones, la mayor parte de la proteína AtQSO2 se ubica en la matriz extracelular, mientras que se detecta poca señal de GFP en la membrana plasmática del protoplasto (Figura 4.45.B). Finalmente para comprobar la presencia de la proteína en la matriz extracelular se procedió a realizar un análisis “Western Blot” de una parte de la hoja que presentaba expresión de AtQSO2 fusionado a GFP, empleando un anticuerpo anti-GFP y se observa que la proteína se ubica en la fracción soluble (Figura 4.45.C), resultado comparable al obtenido en *S. cerevisiae*.

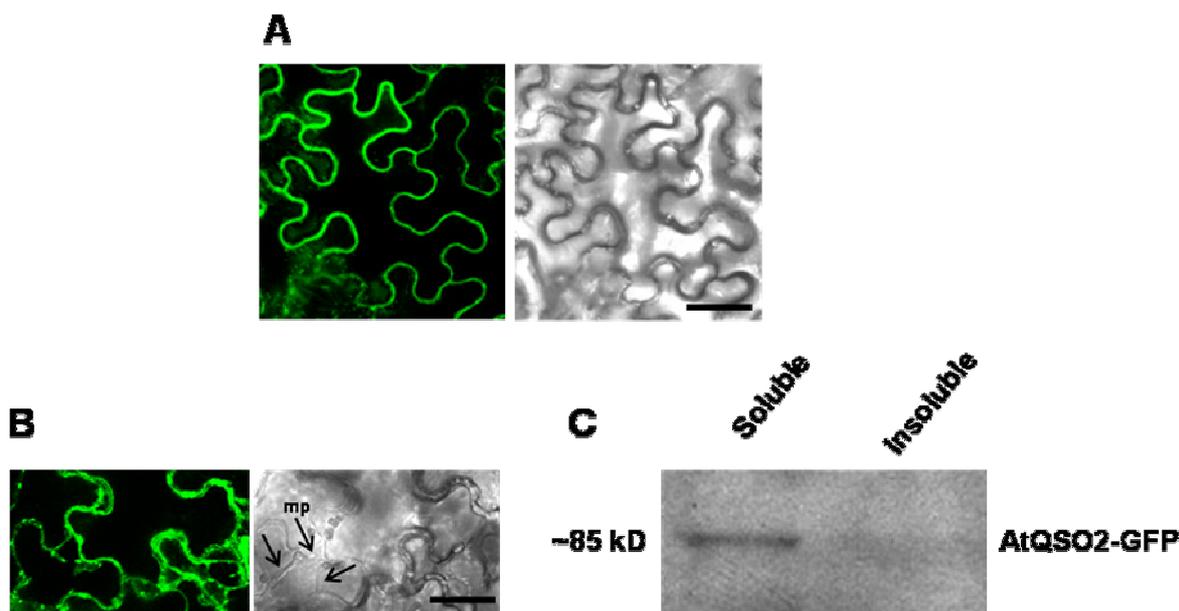


Figura 4.45 A) Célula epidérmica de *N. benthamiana* expresando la construcción *AtQSO2-GFP*. La imagen de la izquierda corresponde a una imagen de fluorescencia, donde el color verde corresponde a la localización de *AtQSO2-GFP*. La imagen de la derecha corresponde a la misma región en campo claro. La escala corresponde a 20 μ M. B) Detalle de una célula epidérmica plasmolizada de *N. benthamiana* expresando la construcción *AtQSO2-GFP*. La imagen de la izquierda corresponde a una imagen de fluorescencia, donde el color verde corresponde a la localización de la expresión de la construcción *AtQSO2-GFP*. La imagen de la derecha corresponde a la misma región en campo claro donde las flechas indican la posición de la membrana plasmática (mp). La escala corresponde a 20 μ M. C) “Western Blot” de proteínas solubles e insolubles de *N. benthamiana* expresando la construcción *AtQSO2-GFP*. Se cargaron 4 μ g de proteínas solubles y 30 μ g de proteínas insolubles. A la izquierda se muestra el peso molecular en kilodaltons (kDa).

4.8.2 La proteína AtQSO2 presenta actividad sulfidril oxidasa

Para comprobar la actividad de la proteína AtQSO2 se expresó la construcción pCM262QSO2 en *S. cerevisiae* y se purificó mediante un sistema de cromatografía de afinidad con resina de agarosa His-Bind (Figura 4.46.A). La actividad sulfidril oxidasa de la proteína AtQSO2 se determinó empleando una serie de compuestos que presentaban uno o dos grupos sulfidrilo (-SH) como 2-mercaptoetanol (ME), glutatión (GSH), ditioneitol (DTT) y ditioeritritol (DTE). El resultado de la actividad sulfidril oxidasa empleando monotioles como sustrato (ME y GSH) muestra una actividad molar⁵ muy baja (entre 0,1 y 1 min^{-1}), pero la actividad molar empleando ditioles (DTT y DTE) presenta valores de 7,34 y 6,76 respectivamente (Figura 4.46.B). Estos resultados se obtuvieron a un pH de 7,5 (que es el pH citoplasmático), pero al ser AtQSO2 una proteína extracelular se comprobó su actividad a un pH de entre 5,5 y 6,5, rango donde se encuentra el pH apoplástico (Gao *et al.*, 2004), y se observó una actividad del 40-60% respecto a la actividad a un pH de 7,5.

⁵ También conocido como número de recambio, se define como la cantidad de sustrato transformado en unidad de tiempo por una cantidad dada de enzima.

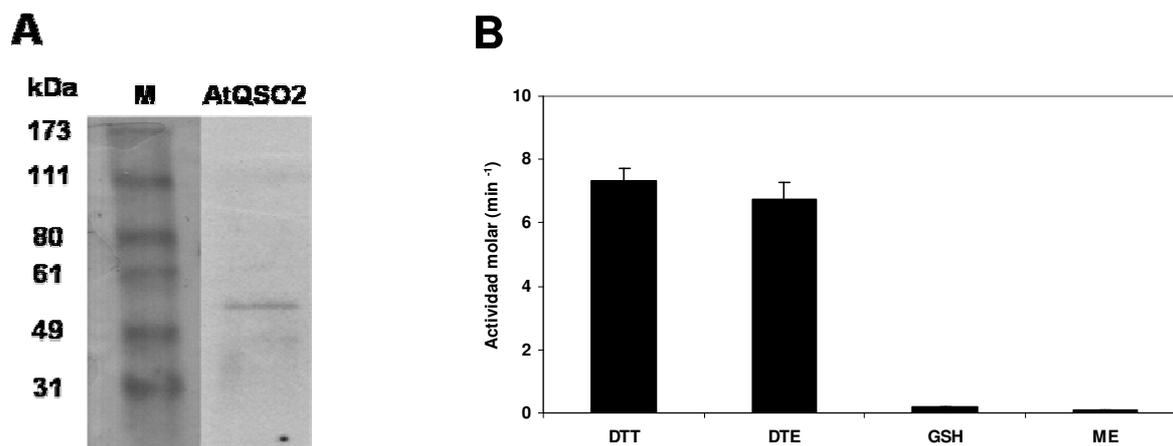


Figura 4.46 A) SDS-PAGE de la proteína AtQSO2 recombinante expresada en *S. cerevisiae* y purificada mediante una columna de cromatografía de afinidad con Ni²⁺. La visualización de la proteína se hizo mediante una tinción con el colorante Coomassie. El patrón de masa molecular (M) está indicado en kilodaltons (kDa). B) Actividad molar de la proteína recombinante AtQSO2 empleando diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=9). DTT (ditiotreitól), DTE (ditioeritritól), GSH (glutatión) y ME (2-mercaptoetanol).

4.8.3 La proteína AtQSO2 no regula la expresión y/o actividad de la bomba H⁺-ATPasa de membrana plasmática

Como hemos visto anteriormente, el principal fenotipo del mutante *par1-1D* (aumento de la expresión de *AtQSO2*) es la menor acumulación de cationes tóxicos, en contraste con el mutante *par1-2* (disminución de la expresión de *AtQSO2*) que acumula mayor cantidad de estos cationes que el control silvestre. Estos fenotipos se podrían explicar por una variación en la abundancia y/o actividad de la bomba H⁺-ATPasa de la raíz, lo que provocaría una variación del potencial de membrana que a su vez influye en la mayor o menor toma de cationes tóxicos, como se ha demostrado en el caso de *S. cerevisiae* (Mulet *et al.*, 1999).

Para comprobar si AtQSO2 afecta a la abundancia de H⁺-ATPasa de membrana se realizó un análisis “Western Blot” utilizando un anticuerpo para la proteína AHA de raíz. Los resultados no muestran diferencias en la cantidad de la proteína AHA ni en el mutante *par1-2* ni en el mutante *par1-1D* comparado con el *Col-7* (Figura 4.47.A). Una vez comprobado que AtQSO2 no regula la expresión de AHA se planteó que podría regular su actividad, por lo tanto se midió la actividad H⁺-ATPasa del control silvestre y los mutantes *par1-2* y *par1-1D* *in vitro*, utilizando como sustrato ATP. Pero en este caso tampoco se obtuvieron diferencias entre los mutantes y el control (Figura 4.47.B).

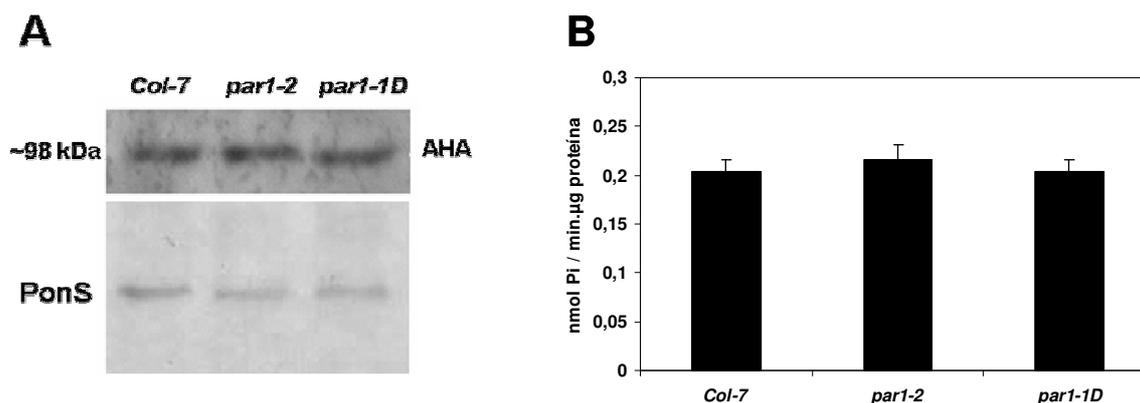


Figura 4.47 A) “Western Blot” de proteínas insolubles de raíz en el control silvestre (*Col-7*) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del gen *AtQSO2* empleando un anticuerpo anti-AHA. Se cargaron 20 µg de proteínas insolubles. El control de carga del gel corresponde a la tinción de proteínas totales con el colorante Ponceau (PonS). A la izquierda se muestra la masa molecular aproximada en kilodaltons (kDa). B) Medida de la actividad de la H⁺-ATPasa en el control silvestre y los mutantes *par1-1D* y *par1-2*. Los valores están expresados en nanomoles (nmol) de fósforo inorgánico (Pi) por minuto (min) y por µg de proteína. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno (n=6).

4.8.4 La proteína AtQSO2 no regula la expresión y/o función del canal de K⁺ AKT1 de membrana plasmática

Otra posibilidad es que AtQSO2 regule la cantidad y/o actividad del canal de K⁺ AKT1, que es el principal sistema para la toma de K⁺ a través de la raíz (Hirsch *et al.*, 1998), ya que uno de los fenotipos del mutante *par1-1D* es la mayor acumulación de K⁺, en contraste con el mutante *par1-2* que acumula menor cantidad de K⁺ que el control silvestre.

En el análisis “Western Blot” (Figura 4.48) no se aprecia diferencia en la expresión de la proteína AKT1 entre el control silvestre y los mutantes *par1-1D* y *par1-2*, lo que parece indicar que AtQSO2 no influye en la abundancia de AKT1.

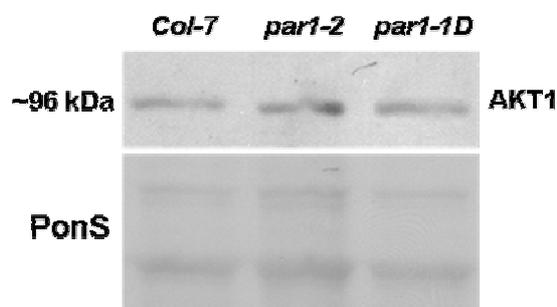


Figura 4.48 “Western Blot” de proteínas insolubles de raíz en el control silvestre (*Col-7*) y en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de expresión del gen *AtQSO2* empleando un anticuerpo anti-AKT1. Se cargaron 20 µg de proteínas insolubles. El control de carga del gel corresponde a la tinción de proteínas totales con el colorante Ponceau (PonS). A la izquierda se muestra la masa molecular aproximada en kilodaltons (kDa).

Como AKT1 puede complementar la función de Trk1,2 en un mutante *trk1,2* de *S. cerevisiae* (Sentenac *et al.*, 1992), se procedió a coexpresar el gen *AKT1* y el gen *AtQSO2* en una mutante *trk1,2* (ver apartado 3.19) y se observó el fenotipo mediante ensayos de goteo en diferentes medios. En la figura 4.49 se comprueba (como se había demostrado previamente) que al expresar *AKT1* en el fondo *trk1,2* se recupera el fenotipo de la cepa silvestre, cosa que no ocurre al expresar *AtQSO2*. Sin embargo la coexpresión de *AKT1* y *AtQSO2* no produce un aumento de la resistencia a cationes tóxicos en comparación con la expresión de *AKT1* de forma individual (Figura 4.49).

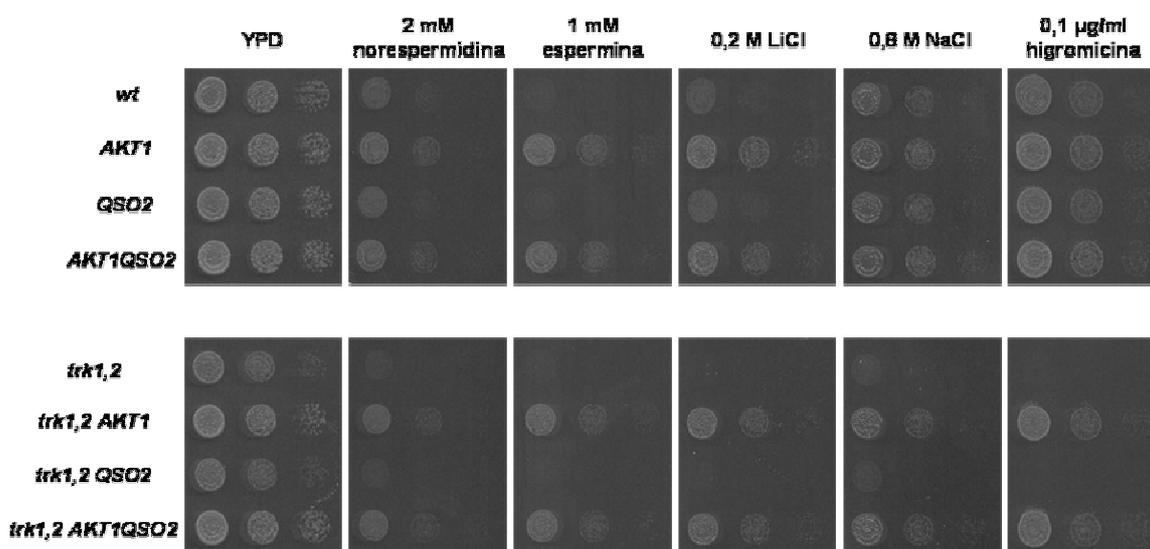


Figura 4.49 Ensayo de goteo de la sobreexpresión del gen *AKT1* y *AtQSO2* en el mutante *trk1,2* y en el control (wt). Se utilizaron 3 diluciones: 1/10, 1/100 y 1/1000. Las fotos se tomaron a los 2 días. Como medio control se empleó un medio rico de crecimiento (YPD).

Finalmente para comprobar *in vivo* si el fenotipo producido por la sobreexpresión de *AtQSO2* se debe a la regulación de AKT1, se sobreexpresó el gen *AtQSO2* en el mutante *akt1-1*, pero las líneas transgénicas analizadas presentan un fenotipo de tolerancia a cationes tóxicos similar a la sobreexpresión de *AtQSO2* en plantas silvestres (Figura 4.50.A y 4.50.B)

4.8.5 El gen *SKOR* no es epistático respecto al gen *AtQSO2*

Una posibilidad interesante es que *AtQSO2* regule la actividad del canal de K^+ SKOR, que se encarga de la carga de K^+ en el xilema (Gaymard *et al.*, 1998). Esta hipótesis se basa en que un aumento de la actividad de SKOR provocaría un incremento de la concentración de K^+ en el xilema y la parte aérea, a la vez se produciría una mayor polarización de la membrana que dificultaría la salida de cationes de las células que rodean el xilema y por

consiguiente una disminución en la cantidad de cationes tóxicos cargados en el xilema. Dado que las líneas con un aumento de la expresión de *AtQSO2* (*par1-ID*, línea 1.2 y línea 1.10) presentan un mayor contenido de K^+ y una menor concentración de cationes tóxicos en el xilema y la parte aérea comparado con el control silvestre (Figuras 4.24, 4.25, y 4.29) y el mutante *par1-2* (menor expresión de *AtQSO2*) presenta un menor contenido de K^+ y una mayor concentración de cationes tóxicos en el xilema y la parte aérea comparado con el control silvestre (Figuras 4.24 y 4.25), parece necesario comprobar la veracidad de la hipótesis planteada.

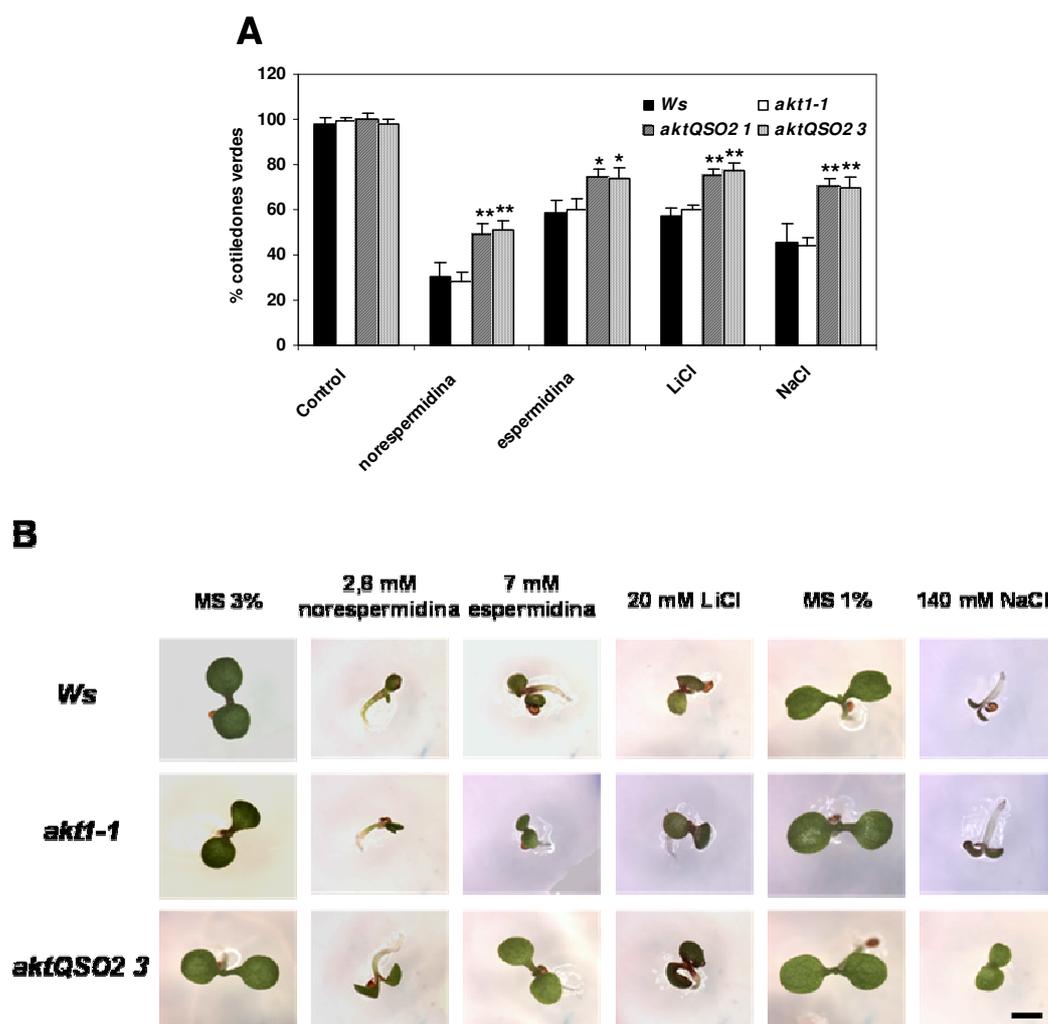


Figura 4.50 A) Porcentaje de cotiledones verdes en el mutante *akt1-1* y en las líneas transgénicas 1 y 3 en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa suplementados con 2,8 mM norespermidina, 7 mM espermidina y 20 mM LiCl, y en MS 1% sacarosa suplementado con 140 mM NaCl. Los datos fueron tomados a los 6 días. Control representa el % de cotiledones verdes presentes en medio MS con 1 y 3% de sacarosa. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes (n=3). * y ** indican que existen diferencias significativas, entre *Ws* y las demás líneas, con un nivel de confianza de 99,5 y 99,9 % respectivamente, mediante una prueba t de Student. **B) Fenotipo del mutante *akt1-1* y la línea transgénica 3 en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos.** Las fotos fueron tomadas después de 6 días y muestran una plántula representativa del fenotipo. La escala corresponde a 2 mm.

El primer paso fue determinar si el mutante *skor1-2* presentaba algún fenotipo de sensibilidad a cationes tóxicos. Para ello se realizó un ensayo de presencia de cotiledones verdes y se observó que el mutante *skor1-2* es más sensible a cationes tóxicos y bajo K^+ que el control silvestre y el mutante *par1-2* (Figura 4.51). Estos resultados nos indujeron a pensar que la carga de K^+ en el xilema es un paso importante en la tolerancia a cationes tóxicos y que *AtQSO2* debía regular esta carga de K^+ en el xilema a través de un canal o transportador, en este caso SKOR.

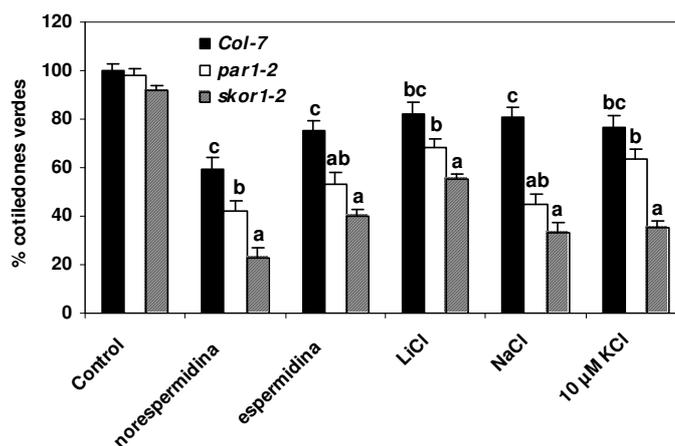


Figura 4.51 Porcentaje de cotiledones verdes en los mutantes *par1-2* y *skor1-2* en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa suplementados con 2,4 mM norespermidina, 6 mM espermidina y 18 mM LiCl, en MS 1% sacarosa suplementado con 120 mM NaCl y medio 1% sacarosa sin K^+ suplementado con 10 μ M de KCl. Los datos fueron tomados a los 6 días. Control representa el % de cotiledones verdes presentes en medio MS con 1 y 3% de sacarosa. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes (n=3). Las columnas con diferentes letras muestran diferencia significativa con un nivel de confianza del 99,5% empleando una prueba de Tukey.

Para comprobar esta hipótesis se construyeron plantas transgénicas sobreexpresando el gen *AtQSO2* en un mutante *skor1-2*. Estas líneas transgénicas presentaban una mayor tolerancia a cationes tóxicos y bajo K^+ que el mutante *skor1-2*, aunque el fenotipo de tolerancia de estas líneas era de la misma magnitud que el mutante *par1-2*, excepto en el caso del medio con bajo K^+ donde el fenotipo de las plantas transgénicas sobreexpresando *AtQSO2* fue de un mayor crecimiento que el control silvestre (Figura 4.52.A y 4.52.B).

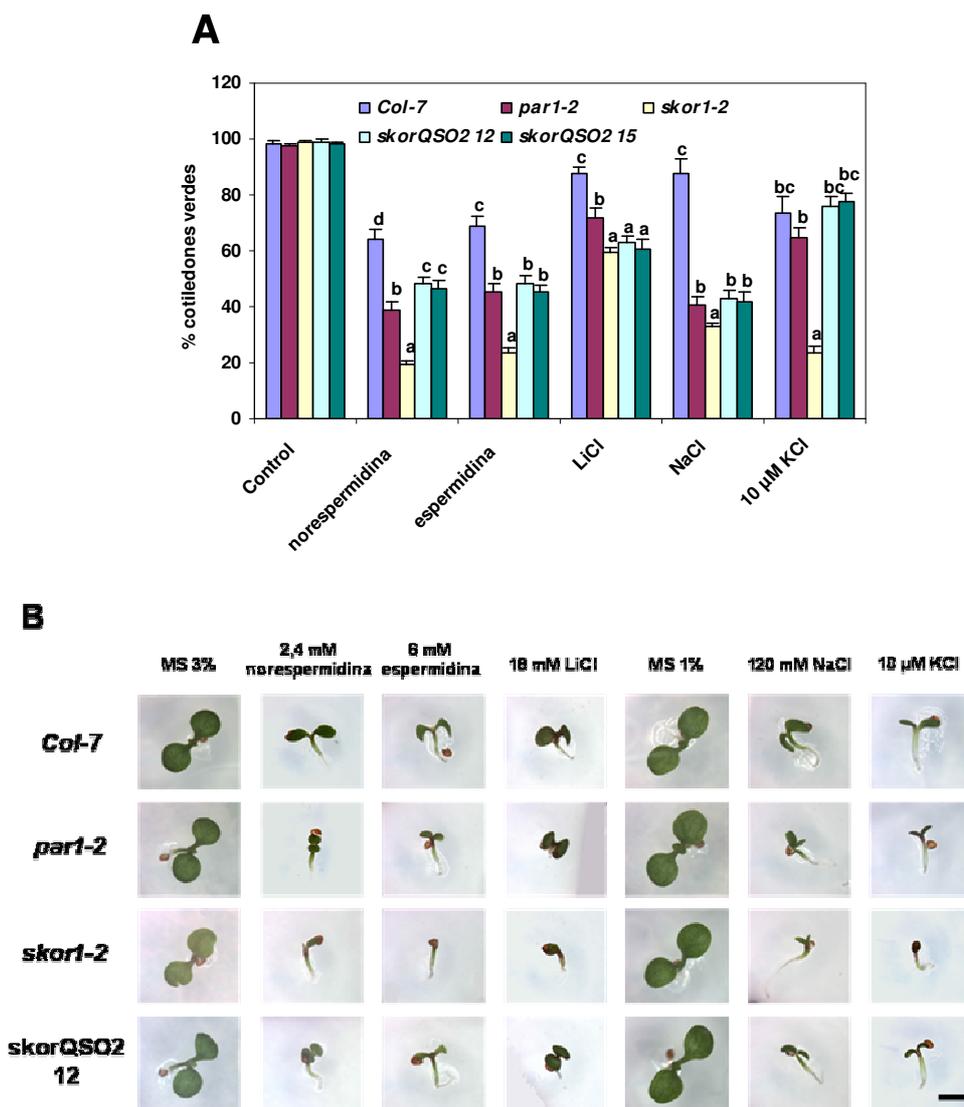


Figura 4.52 A) Porcentaje de cotiledones verdes en los mutantes *par1-2*, *skor1-2* y en las líneas transgénica 12 y 15 en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos. Las semillas se sembraron en medio MS 3% sacarosa suplementados con 2,4 mM norespermidina, 6 mM espermidina, 18 mM LiCl, en MS 1% sacarosa suplementado con 120 mM NaCl y medio 1% sacarosa sin K^+ suplementado con 10 μ M de KCl. Los datos fueron tomados a los 6 días. Control representa el % de cotiledones verdes presentes en medio MS con 1 y 3% de sacarosa. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes (n=3). Las columnas con diferentes letras muestran diferencia significativa con un nivel de confianza del 99,5% empleando una prueba de Tukey. **B) Fenotipo de los mutantes *par1-2*, *skor1-2* y la línea transgénica 12 en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos.** Las fotos fueron tomadas después de 6 días y muestran una plántula representativa del fenotipo. La escala corresponde a 2 mm. Control silvestre (*Col-7*)

Discusión

5.1 Búsqueda y aislamiento de mutantes resistentes a norespermidina

Anteriormente se habían realizado trabajos empleando altas cantidades de NaCl en búsqueda de mutantes tolerantes a la salinidad, pero los mutantes obtenidos eran resistentes al efecto osmótico que produce el NaCl y no al efecto tóxico del ión Na⁺ *per se*. Debido a este problema los mutantes resistentes a NaCl presentaban mutaciones en genes implicados en la síntesis y percepción de ABA (Quesada *et al.*, 2000, González-Guzmán *et al.*, 2002, Ruggiero *et al.*, 2004), hormona inducida en condiciones de estrés osmótico (Wilkinson y Davies, 2002). En este trabajo se demuestra que es posible usar un polication tóxico a bajas concentraciones (norespermidina) para obtener mutantes tolerantes a cationes tóxicos, sin el problema de un efecto osmótico subyacente.

Las condiciones empleadas en el rastreo primario y secundario (concentración de norespermidina, tiempo de crecimiento y estado de la plántula) pueden considerarse adecuadas, ya que de aproximadamente 165000 semillas, se escogieron como posibles individuos resistentes el 0,13%, un porcentaje de individuos manejable para posteriores análisis. Finalmente, de los posibles individuos resistentes se confirmaron como resistentes a norespermidina el 3,8% (Tabla VII).

Tabla VII. Resultados del rastreo de la colección de semillas marcadas con el activador transcripcional. Posibles individuos resistentes (población S₁), individuos resistentes (población S₂).

Ecotipo	Mutagénesis	Líneas analizadas	Semillas analizadas	Posibles individuos resistentes	Individuos resistentes
Columbia (Col-7)	T-DNA con activador transcripcional	16398	164000	210	8

Los 8 mutantes obtenidos del rastreo presentaron diferentes grados de tolerancia a norespermidina (Figura 4.2), pero para posteriores análisis era importante elegir un candidato que tuviera una alta tolerancia a norespermidina y que presentara el T-DNA en su genoma. El hecho de tener en cuenta la presencia o no del T-DNA en los individuos es importante ya que, en el caso de que exista correlación entre el fenotipo de resistencia a norespermidina y la presencia de T-DNA, se puede emplear la técnica del rescate plasmídico o TAIL PCR para ubicar la posición del T-DNA en el genoma; pero, si un mutante tiene fenotipo de resistencia a norespermidina y no presenta el T-DNA, la ubicación de la mutación se realiza mediante un mapeo cromosómico que es un proceso largo y laborioso.

Teniendo en cuenta los argumentos anteriores se escogió el mutante 21341-1. Los otros 3 mutantes resistentes a norespermidina y que presentan el T-DNA en su genoma: 23108, 21365-2 y 21370-2 (Figura 4.4) no fueron considerados en este trabajo, ya que el mutante 23108 fue analizado en un trabajo de Fin de Carrera (Ezquer, 2005) y los otros dos presentaban un fenotipo de tolerancia a cationes muy variable (datos no mostrados).

Tras comprobar que el mutante 21341-1 presenta una mutación dominante que segrega como un único *locus*, este mutante se denominó ***par1-ID*** (polyamine resistant 1), según la nomenclatura propuesta por Meinke y Koornneef (1997). Posteriormente, se llevó a cabo el rescate plasmídico y se localizó la inserción de T-DNA en la región 5'UTR del *locus* At1g15030.

Finalmente, el análisis “Southern Blot” mostró la presencia de 2 bandas en 60 individuos de la generación F₂ resistentes a norespermidina (Figura 4.6.A) y con el rescate plasmídico se obtuvo un plásmido que correspondía solo a T-DNA (plásmido que se genera cuando existen dos T-DNA contiguos). Pero al observar los tamaños de las bandas del “Southern Blot” se comprobó que no correspondían con los tamaños esperados si ocurriera una integración en tándem de dos T-DNA completos. Por lo que se puede concluir que *par1-ID* presenta una integración compleja de T-DNA que cosegrega con el fenotipo de resistencia a norespermidina.

5.2 *par1-ID* es un mutante de ganancia de función del *locus* At1g15020

Después de ubicar el sitio de integración del T-DNA en el genoma del mutante *par1-ID* fue necesario hacer una comprobación de los niveles de expresión de los *loci* adyacentes a la inserción, ya que pueden existir mutantes de líneas marcadas con el activador transcripcional que tengan ganancia (Sun *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2005, Koch *et al.*, 2006) o pérdida (González-Guzmán *et al.*, 2002) de función de un gen adyacente a la inserción de T-DNA.

La elección de los *loci* a analizar se hizo teniendo en cuenta la distancia máxima a la cual las 4 copias del 35s pueden producir la sobreexpresión de un gen. Según Weigel *et al.* (2000), esta distancia es de 5 kb, por lo cual se eligieron los *loci* At1g15020 y At1g15030; los *loci* At1g15010 y At1g15040 no se eligieron porque se encuentran a una distancia mínima aproximada de 6 kb (considerando, como mínimo, las 5 kb de la integración compleja de

T-DNA) (Figura 4.5.C). Así se observó que el mutante *par1-ID* tiene una disminución de la expresión del *locus* At1g15030 y un aumento de la expresión del *locus* At1g15020. El siguiente paso fue realizar un ensayo con la sobreexpresión de At1g15020 y la pérdida de función de At1g15030 para observar cual de los dos presentaba el fenotipo de tolerancia a norespermidina, reproduciéndose el fenotipo solo con la sobreexpresión de At1g15020 (Figura 4.7.C). Este *locus* estaba anotado como *ATQSOX1* perteneciente a la familia PDIL (proteínas similares a una disulfuro isomerasa) que son moléculas chaperonas que contienen un dominio tioredoxina (TRX) y participan en la formación de enlaces disulfuro durante el plegamiento de proteínas (Houston *et al.*, 2005). Pero en este trabajo se ha preferido mantener el primer nombre con que apareció en la primera publicación donde fue mencionado (Thorpe *et al.*, 2002) aunque utilizando solo 3 letras en su nombre, así que este gen fue denominado *AtQSO2*. Este gen pertenece a la familia de las sulfidril oxidasas QSOX cuya principal función es generar puentes disulfuro

5.3 El gen *AtQSO2* codifica una proteína de la familia QSOX con actividad sulfidril oxidasa

Mediante un análisis de dominios de la proteína codificada por el gen *AtQSO2* se determinó que la proteína pertenece a la familia QSOX (Thorpe *et al.*, 2002, Coppock y Thorpe, 2006). Esta familia se encuentra en los metazoos, plantas superiores y protozoos, pero no se encuentra en hongos (Coppock y Thorpe, 2006). En hongos solo se conocen proteínas de la familia ERV1/ALR que son homólogas al dominio C-terminal de la familia QSOX (Coppock *et al.*, 1998). Basándose en estudios de las proteínas QSOX de humanos, se ha propuesto que estas proteínas estarían involucradas en la elaboración de la matriz extracelular y en la regulación del estado redox (Hooper y Thorpe, 1999, Coppock *et al.*, 2000), así como en el plegamiento de proteínas (Thorpe *et al.*, 2002). El estudio de esta familia se ha centrado exclusivamente en mamíferos y aves, donde solo se ha podido demostrar su localización en diferentes tejidos y su actividad sulfidril oxidasa, pero aún no se ha determinado su función específica (Coppock y Thorpe, 2006). En humanos, solo se ha visto que la pérdida o ganancia de expresión de *HsQSOX2* confiere resistencia o sensibilidad, respectivamente, a la muerte celular inducida por interferón gamma (Wittke *et al.*, 2003).

En plantas no se ha realizado ningún estudio de las proteínas QSOX, aunque se conoce su presencia por análisis de bases de datos (Thorpe *et al.*, 2002). Así tenemos que dos proteínas en *Arabidopsis* están anotadas como miembros de esta familia pero no se ha

realizado hasta ahora ninguna aproximación genética (caracterización fenotípica de mutantes en estos genes) o funcional (comprobar actividad sulfidril oxidasa y/o función celular). Solo se ha descubierto en *Arabidopsis* una proteína de la familia ERV1/ALR llamada AtErv1 ubicada en mitocondria, que estaría implicada en la maquinaria de ensamblaje de proteínas ferrosulfurosas (Levitan *et al.*, 2004). En este trabajo se ha comprobado la presencia de 2 miembros de la familia QSOX en *Arabidopsis*, se ha clonado el gen *AtQSOX2* y se ha demostrado, por primera vez, la actividad sulfidril oxidasa de una proteína QSOX de plantas, asimismo se ha determinado su localización en los diferentes órganos de la planta y a nivel celular.

La actividad sulfidril oxidasa de esta proteína se midió usando mono y ditioles como sustratos, observándose una preferencia por DTT y DTE, sobre los monotioles (Figura 4.46.B). Estos datos están en concordancia con los observados en otros miembros de la familia QSOX. Por ejemplo QSOX1 de aves cataliza la oxidación de grupos sulfidrilo de proteínas con grupos disulfuro (lisozima, RNAasa) y del DTT, pero no actúa sobre GSH (Hooper *et al.*, 1999b, Hooper y Thorpe, 1999). Del mismo modo rQSOX de rata y CpQSOx1 de cobaya catalizan la oxidación de DTT (Benayoun *et al.*, 2001, Amiot *et al.*, 2004). La proteína AtErv1 también muestra preferencia por ditioles sobre los monotioles (Levitan *et al.*, 2004).

Los bajos valores de actividad molar obtenidos en este trabajo pueden ser debidos a la técnica de medición de la actividad, ya que el ensayo de actividad consistió en medir la desaparición de grupos sulfidrilo de forma discontinua usando DNTB y es posible que una baja concentración de oxígeno disuelto en las muestras haya limitado el consumo de grupos sulfidrilo (Hooper y Thorpe, 2002).

La presencia de 2 isoformas en el gen *AtQSO2* ha sido descrita también para los genes *HsQSOX1* (Thorpe *et al.*, 2002) y *rQSOX* (Radom *et al.*, 2006). Estas 2 isoformas de *AtQSO2* varían en 26 aa ubicados en el último exón, sin embargo esta variación es pequeña y casi no modifica el pI de la proteína. Además, estos aminoácidos no se ubican en ningún dominio de la proteína por lo que no parece que haya una variación en la estructura y/o actividad de estas isoformas, aunque se ha planteado que isoformas de proteínas QSOX pueden tener un patrón de expresión diferente en cada tejido (Radom *et al.*, 2006).

En el análisis “Western Blot” de la figura 4.46.A se puede observar un peso molecular de aproximadamente 55 kDa para la proteína AtQSO2, pero en la tabla VI se indica que la

isoforma *QSO2.2* (isoforma usada en la construcción de la fusión AtQSO2-HA) tiene un peso molecular probable de 60 kDa. Esta discrepancia puede deberse a que los exones e intrones del gen *AtQSO2* son putativos pero no comprobados. Por otro lado, podrían existir modificaciones post-trascripcionales ya que existen 3 posibles sitios de N-glicosilación donde se pueden agregar carbohidratos como ocurre en el caso de HsQSOX2 (Wittke *et al.*, 2003) y rQSOX (Benayoun *et al.*, 2001). En este caso, el peso molecular de la proteína AtQSO2 sería aún mayor y no se podría explicar el “Western Blot” de la figura 4.46.A donde migra como una proteína más pequeña.

En la región C-terminal de la proteína AtQSO2 se encuentra un posible dominio transmembrana de 15-20 aa, este dominio se encuentra en todos los miembros de la familia QSOX (Coppock y Thorpe, 2006) y podría provocar el anclaje de la proteína en la membrana plasmática, aunque es posible que este dominio solo sea una región altamente hidrofóbica que ayude a la formación de la estructura proteica, ya que en los experimentos de localización de AtQSO2 en *S. cerevisiae* se ha visto que esta proteína se ubica en la fracción soluble del extracto de proteínas totales (Figura 4.44.A) que corresponde a proteínas citosólicas y periplasmáticas, así que AtQSO2, en principio, no es una proteína de membrana. Pero es importante mencionar que la purificación de proteínas de membrana se llevó a cabo a solo 13000 rpm, por lo que es posible que existan microsomas en la fracción soluble que contaminen con proteínas de membrana la fracción soluble. Por tanto, no se puede descartar la relación de esta proteína con la membrana plasmática, ya que AtQSO2 presenta un posible sitio de miristoilación que la anclaría a membrana. Por otro lado, para comprobar la ubicación extracelular de la proteína AtQSO2, predicha por su péptido señal, se empleó la enzima zimoliasa para eliminar la pared celular y se observó que solo el 30% de la proteína es secretada (Figura 4.44.B).

A primera vista, el resultado anterior parecería indicar que AtQSO2 está ubicado tanto en el periplasma como en el interior de la célula, lo que concuerda con los resultados obtenidos en humanos y ratas donde AtQSO2 ha sido detectado en ER y aparato de Golgi (Thorpe *et al.*, 2002, Tury *et al.*, 2004). Una explicación es que AtQSO2 está implicada en la maduración de proteínas de membrana, este proceso de maduración comienza cuando la proteína de membrana sale del ER o aparato de Golgi, para después formar la vesícula de secreción que lleva la proteína “madurada” a la membrana plasmática. Es importante mencionar la ausencia de señales de retención en ER, así como la presencia de actividad sulfidril oxidasa a un rango de pH ácido (5,5-6,5), lo que le permitiría funcionar en el espacio

extracelular (apoplasto) de las células vegetales cuyo pH se encuentra entre 5,3 y 6,7 (Gao et al., 2004). Esto último, refuerza la idea de que AtQSO2 es una proteína secretada y su ubicación intracelular se debe, solamente, a que se encuentra en vesículas de secreción, ER, aparato de Golgi, etc.

La presencia en la matriz extracelular de AtQSO2 en células vegetales se comprobó mediante la expresión transitoria de la fusión QSO2-GFP en células epidermales de *N. benthamiana* plasmolizadas con manitol (Figura 4.45). La plasmólisis de células separa la membrana plasmática de la pared celular, permitiendo así poder visualizar cada región por separado y conocer la ubicación de proteínas periplasmáticas y de membrana; esta técnica ha sido empleado con éxito en diferentes trabajos (Lertpiriyapong y Sung, 2003, Yang y Showalter, 2007). Aunque AtQSO2 se localice parcialmente en el exterior de la célula, es muy probable que su actividad fisiológica se desarrolle en el camino de secreción.

5.4 El aumento de expresión de *AtQSO2* produce un fenotipo pleiotrópico de resistencia a cationes tóxicos

En este trabajo se ha demostrado que un aumento en la expresión del gen *AtQSO2* produce una mayor tolerancia a NaCl, LiCl, norespermidina y espermidina. De manera opuesta, una pérdida o disminución de la expresión de *AtQSO2* provoca una mayor sensibilidad a estos cationes tóxicos. El aumento de la tolerancia a NaCl puede estar relacionado con una mayor resistencia a estrés osmótico (Zhu, 2001), pero los mutantes con ganancia o disminución de expresión de *AtQSO2* no presentan diferencias en la germinación y/o tamaño de los cotiledones respecto al control en medio MS con manitol. Por otro lado, el NaCl (Apel y Hirt, 2004) y el LiCl podrían inducir la producción de ROS, pero los mutantes analizados no presentan diferencias respecto al control en condiciones de estrés oxidativo. Por lo tanto se puede concluir que el fenotipo producido por la ganancia o disminución de expresión de *AtQSO2* es específico para toxicidad iónica.

El mutante *par1-ID* presenta un mayor porcentaje de cotiledones verdes en medios suplementados con diferentes cationes tóxicos, empleando 1 ó 3% de sacarosa. 3% de sacarosa representa aproximadamente 90 mM de sacarosa y podría generar un estrés osmótico, pero en condiciones control (medio MS), las plántulas presentan el mismo tiempo de germinación y tamaño de cotiledones en 1 y 3 % de sacarosa (Figuras 4.10 y 4.11). En medios suplementados con poliaminas, el porcentaje de cotiledones verdes disminuye en

medios con 3% de sacarosa comparado con 1%, pero sigue siendo mayor el porcentaje en el mutante *par1-ID* respecto al control silvestre (Figura 4.10). *par1-ID* presenta también un mayor tamaño de cotiledones comparado con el control silvestre en condiciones de estrés iónico. Esto se cuantificó considerando el peso fresco de plántulas sometidas a diferentes estreses (Figura 4.11). El mayor porcentaje de cotiledones verdes y el incremento en el tamaño de los cotiledones se observa desde los 3 días hasta los 6 días (datos no mostrados), a partir de los 7 días las plántulas empiezan a desarrollar hojas secundarias y las diferencias en el tamaño y germinación se reducen. En el caso de las poliaminas, a partir del 7° día los cotiledones de las plántulas empiezan a mostrar signos de necrosis, con la posterior muerte de las plántulas a partir del décimo día. La longitud de la raíz principal está inhibida en los diferentes medios con cationes tóxicos en ensayos de crecimiento vertical (datos no mostrados), pero no hay diferencias entre el control silvestre y *par1-ID*. Esto nos indica que el fenotipo de resistencia a cationes tóxicos del mutante *par1-ID* es específico de la parte aérea.

Las líneas 2 y 10 que sobreexpresan *AtQSO2* tienen el mismo fenotipo de tolerancia a cationes tóxicos que el mutante *par1-ID*, lo que confirma que es el aumento de expresión de *AtQSO2* lo que produce el fenotipo de resistencia. El nivel de expresión de *AtQSO2* es mucho mayor en las líneas 2 y 10 en comparación con el mutante *par1-ID* (Figuras 4.7 y 4.26), pero estas líneas y *par1-ID* presentan el mismo fenotipo de tolerancia (Figura 4.27), por lo que el nivel de tolerancia a cationes tóxicos es ya máximo en *par1-ID* y no mejora al incrementarse la expresión de *AtQSO2* en las líneas 2 y 10.

Los mutantes por pérdida o disminución de expresión de *AtQSO2* presentan el fenotipo opuesto a los mutantes por aumento de expresión de *AtQSO2*, es decir, son sensibles a cationes tóxicos. En todos los casos las concentraciones de cationes tóxicos fueron menores a las usadas para ver los fenotipos del mutante *par1-ID* y las líneas 2 y 10, ya que el fenotipo de sensibilidad de los mutantes *par1-2*, *par1-3* y *par1-4* se observa mejor a estas concentraciones. La sensibilidad a estos cationes está basada en su menor porcentaje de cotiledones verdes y peso fresco comparado con el control silvestre en medio MS suplementado con diferentes cationes tóxicos (Figura 4.15). Además, una sensible disminución en la expresión de *AtQSO2* (8 y 6 veces menos para *par1-2* y *par1-3*, respectivamente) produce el mismo fenotipo de sensibilidad a cationes tóxicos que la pérdida total de expresión (Figuras 4.9 y 4.15). Una posible explicación es que la disminución de la expresión de *AtQSO2* conduzca a una casi nula producción de proteína, como en el caso de

los mutantes *as1* y *as2* del gen *AtCNGC10* (Borsics *et al.*, 2007) y así estos tres mutantes tengan, prácticamente, niveles inexistentes de la proteína AtQSO2.

Los 3 mutantes presentan un menor desarrollo de la plántula y un menor tamaño de los cotiledones comparados con el control silvestre en medios MS con diferentes cationes, desde los 3 días hasta los 8 días, a partir del cual las plantas del control silvestre empiezan a presentar síntomas de necrosis en las hojas (datos no mostrados). Para simplificar la presentación de los resultados se escogió un solo mutante del gen *AtQSO2* (*par1-2*) ya que los 3 mutantes analizados presentan un fenotipo similar en su sensibilidad a cationes tóxicos en medio MS.

En planta adulta se realizaron 2 tipos de ensayo para determinar si existen diferencias en la tolerancia o sensibilidad a cationes tóxicos dependiendo del estadio de la planta. El primer experimento consistió en colocar una cantidad de semillas determinada en tierra y regar periódicamente con bajas concentraciones de NaCl y LiCl (Rausell *et al.*, 2004), esto permite una acumulación progresiva de Na⁺ y Li⁺ en la planta y corresponde a una situación de adaptación a terrenos salinos. Los resultados mostraron una mayor tolerancia a NaCl y LiCl en el mutante *par1-ID* respecto al control silvestre (Figura 4.12), pero las líneas 2 y 10 no presentaban diferencias (datos no mostrados), además el mutante *par1-2* presentó sensibilidad a LiCl pero no a NaCl (Figura 4.17). Estos resultados variables pueden ser debidos a la tasa de evaporación, ya que un aumento en la transpiración produce una entrada más rápida de cationes tóxicos a la planta junto a una mayor toma de solución nutritiva (McDonald *et al.*, 2002, Caird *et al.*, 2007, Howard y Donovan, 2007). Los resultados de la figura 4.12 y 4.17 corresponden a experimentos realizados en verano y en condiciones de baja humedad relativa (60-70% humedad relativa). Al realizar el mismo experimento en invierno y condiciones de menor transpiración (70-80% humedad relativa), las diferencias entre *par1-ID* y *Col-7* se redujeron (datos no mostrados). En el caso de las líneas 2 y 10, se observaron ligeras diferencias (líneas transgénicas más tolerantes que *Col-7*) en verano, pero en invierno, el fenotipo de las líneas transgénicas y *Col-7* fue similar. Cuando se observó el fenotipo de plantas *par1-2* irrigadas con NaCl ocurrió lo mismo, es decir, ligera sensibilidad de *par1-2* respecto a *Col-7* en verano, pero en invierno no se vio fenotipo (datos no mostrados). Esta diferencia en los fenotipos a cationes tóxicos dependientes de la humedad y la transpiración también se ha observado en el mutante *sas1* (Nublat *et al.* 2001).

Los resultados anteriores no invalidan la idea de que el aumento o pérdida de expresión de *AtQSO2* produce tolerancia o sensibilidad, respectivamente, a cationes tóxicos ya que cuando se llevó a cabo el segundo tipo de experimento consistente en un choque de estrés iónico con altas concentraciones de NaCl y LiCl, las líneas transgénicas y el mutante *par1-1D* fueron más tolerantes que el control silvestre (Figuras 4.13 y 4.28), mientras que el mutante *par1-2* fue más sensible (Figura 4.18). El fenotipo de tolerancia a NaCl y LiCl está asociado a una menor necrosis de las hojas de la roseta en ambos casos y a un mayor desarrollo de la parte aérea en el caso del LiCl. El estrés iónico por LiCl produce un fenotipo característico de necrosis del ápice del tallo principal y ramas secundarias que aparece antes en el control silvestre. Esta necrosis puede ser debida a una mayor acumulación de Li⁺ en tejidos en crecimiento (primordios apicales).

5.5 Fenotipo del mutante *qso1* y expresión de los genes *AtQSO1* y *AtQSO2*

Los mutantes *qso1-1* y *qso1-2* no presentan diferencias en la acumulación de cationes tóxicos comparados con el control silvestre (datos no mostrados), además, no tienen el mismo fenotipo de sensibilidad a cationes tóxicos que los mutantes en el gen *AtQSO2*, salvo en el caso del NaCl (Figuras 4.36 y 4.37), donde el mutante *qso1-2* muestra sensibilidad. La sensibilidad de uno de los 2 mutantes del gen *AtQSO1* a NaCl es debida probablemente al nivel de expresión, ya que el mutante *qso1-2* presenta una menor expresión del gen *AtQSO1* comparado con el mutante *qso1-1* (Figura 4.35). Este fenotipo del mutante *qso1-2* es específico del ión Na⁺, ya que este no presenta tolerancia en medio MS con KCl, manitol (estrés osmótico) o H₂O₂ (estrés oxidativo) (datos no mostrados).

Mediante el análisis de RT-PCR no se ha podido determinar específicamente los niveles de expresión en los diferentes tejidos de la raíz, pero revisando los datos del mapa de expresión génica en raíces de *Arabidopsis* (Birnbaum *et al.*, 2003) se observó que los genes *AtQSO1* y *AtQSO2* se expresan en todos los tejidos de la raíz. El mayor nivel de expresión observado en la figura 4.39 del gen *AtQSO1* respecto a *AtQSO2* en raíz, se correlaciona con el número de ESTs identificados en la base de datos de TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) donde hay 49 ESTs para *AtQSO1* y 21 ESTs para *AtQSO2*. Además, el nivel de expresión del gen *AtQSO1* es aproximadamente 3 veces mayor que el de *AtQSO2* en diferentes zonas de la raíz (Birnbaum *et al.*, 2003), resultado que concuerda cualitativamente con los obtenidos

mediante RT-PCR (Figura 4.39) y usando la base de datos GENEVESTIGATOR (Figura 4.40).

En la figura 4.40 se puede observar partes de la planta cuyos valores de expresión para los genes *AtQSO1* y *AtQSO2* están por encima de los obtenidos por RT-PCR cuantitativa para flores, tallos, raíces, hojas caulinares y adultas. Esto se debe a que en los experimentos de RT-PCR realizados se considera el RNA de una parte amplia de la planta; en cambio en los experimentos de micromatrices se ha considerado el RNA de una parte específica. Por ejemplo, en el caso de las flores, se ha considerado para la RT-PCR cuantitativa todo el RNA de los pétalos, estambres, sépalos, estigma, polen, ovarios y pedicelo, pero en los experimentos de micromatrices se ha considerado el RNA de polen de forma individual. Así que si existe una expresión moderada del gen *AtQSO2* en el polen, en el experimento de micromatrices se puede observar el resultado, pero en la RT-PCR cuantitativa no se observa ya que la cantidad de RNA de polen es muy pequeña comparada con el total de la flor.

A pesar de que existe una mayor expresión del gen *AtQSO1* comparado con el gen *AtQSO2* en la raíz, es posible que estos genes se expresen en tejidos radiculares diferentes, por lo que tendrían funciones y/o sustratos diferentes; por ejemplo en flores *AtQSO1* se expresa más que *AtQSO2*, pero en el polen y estambres, *AtQSO2* se expresa más que *AtQSO1* (Figura 4.40). También es probable que estas proteínas tengan una regulación postrascricional, activándose solamente *AtQSO2* en condiciones de estrés. Un patrón diferente de expresión de genes de la familia QSOX se puede observar en humanos (Wittke *et al.*, 2003) donde la expresión de cada homólogo de QSOX es diferente dependiendo del órgano o tejido (Coppock y Thorpe, 2006). Además, la expresión de genes de la familia QSOX puede estar restringida a células específicas en diferentes órganos (Tury *et al.*, 2006). Pero, en la base de datos AREX (<http://www.arexdb.org>) se observa que el patrón de expresión de los 2 genes en distintos tejidos de la raíz es prácticamente idéntico, por lo que la proteína *AtQSO1* estaría ubicada en los mismos tejidos que *AtQSO2* pero tendría funciones distintas, ya que los fenotipos de los mutantes *qso1* y *qso2* son diferentes y los patrones de expresión en diferentes estreses también varían (Figura 4.41).

Esta diferencia de expresión en genes de una misma familia ocurre en el caso de los transportadores KUP, donde el ayuno de potasio provoca un aumento de la expresión *HAK5* y la disminución de *KUP2* (Armengaud *et al.*, 2004), sus patrones de expresión según AREX son similares en los diferentes tejidos de la raíz pero presentan funciones diferentes: *HAK5*

está implicado en la toma de K^+ del medio y KUP2 promueve la expansión celular (Elumalai *et al.*, 2002, Gierth *et al.*, 2005). Con respecto a *AtQSO2*, es importante resaltar que se induce 2 veces durante un ayuno de potasio (Figura 4.41). Además, el aumento de la expresión de *AtQSO2* está relacionado con la mayor toma y acumulación en la parte aérea de K^+ (Figuras 4.24 y 4.25) y, como se ha demostrado en este trabajo, es muy posible que el aumento en la toma de K^+ mejore la tolerancia a cationes tóxicos. La toma de K^+ en condiciones de estrés iónico es importante para evitar los efectos perjudiciales de un exceso de iones, por ejemplo, a baja concentración de K^+ el mutante *akt1* es muy sensible a NaCl respecto al control silvestre (Qi y Spalding, 2004) y en experimentos realizados en el laboratorio se comprobó que el mutante *akt1* también es más sensible a LiCl y norespermidina que el control silvestre en medio con bajo potasio (datos no publicados).

AtQSO1 se reprime a la mitad en condiciones de ayuno de potasio, esta disminución en la expresión no se relaciona con su contenido de potasio, ya que los mutantes *qso1* no difieren en la concentración de K^+ en la raíz y parte aérea comparado con el control silvestre (datos no mostrados). *AtQSO1* se induce por LiCl, peróxido de hidrógeno y NaCl. Es importante mencionar que los mutantes *qso1-1* y *qso1-2* no presentan fenotipo en medios con LiCl y peróxido de hidrógeno, pero el mutante *qso1-2* es sensible a NaCl (Figura 4.36). Es posible que el gen *AtQSO1* esté implicado en la traslocación de Na^+ entre la raíz y la parte aérea, ya que el mutante *qso1-2* no presenta diferencias en la acumulación de Na^+ respecto al control silvestre (datos no mostrados).

Según la base de datos GENEVESTIGATOR, existe una inducción de 2 veces en la expresión de *AtQSO1* cuando se aplica siringolina en las hojas (Figura 4.42), la siringolina está implicada en la inducción de nuevos transcritos de genes y en el aumento de la protección contra mildiu en trigo y *Arabidopsis* (Waspi *et al.*, 2001, Michel *et al.*, 2006). La inducción de *AtQSO1* por siringolina es específica de este homólogo, ya que *AtQSO2* no presenta variación en su expresión debido a la siringolina (Anexo 3). Mediante un tratamiento con cicloheximida *AtQSO1* y *AtQSO2* ven disminuida su expresión aproximadamente a la mitad (Figura 4.42 y 4.43), la cicloheximida es un inhibidor de la síntesis de proteínas que induce la expresión de genes del metabolismo de giberelinas dependientes de auxinas (Frigerio *et al.*, 2006) y bloquea la inducción de genes mediada por ácido jasmónico (Rojo *et al.*, 1998), así que es posible que los genes de la familia QSOX en *Arabidopsis* estén regulados por ácido jasmónico, ya que existen genes relacionados con el metabolismo de ácido jasmónico que son inducidos en condiciones de bajo potasio (Armengaud *et al.*, 2004). Finalmente, la expresión

de *AtQSO2* se reduce a la mitad en medio con glucosa (Figura 4.43), la explicación de este resultado es un poco confusa ya que la glucosa genera diferentes perfiles de expresión en diferentes grupos funcionales de genes (Price *et al.*, 2004). En este caso la disminución de la expresión de *AtQSO2* observada en medio con glucosa puede ser un efecto indirecto debida a la disminución de la expresión de algún factor de transcripción o la activación/represión de genes del metabolismo de hormonas que regulen *AtQSO2*.

5.6 *AtQSO2* no regula la toma de K⁺ en la epidermis de la raíz

En un primer momento se planteó que la función de *AtQSO2* en la tolerancia a cationes tóxicos era la de regular el potencial de membrana de las células de la epidermis y córtex de raíz a través de la toma de K⁺ del medio. Esta hipótesis se basa en que una disminución del potencial de membrana como consecuencia de una mayor toma de K⁺, impediría la entrada inespecífica de cationes tóxicos. En levaduras se ha demostrado que un aumento o disminución del potencial de membrana produce sensibilidad o resistencia, respectivamente, a diferentes cationes tóxicos (Mulet *et al.*, 1999, Goossens *et al.*, 2000). Sin embargo los resultados obtenidos no apoyan esta hipótesis.

En primer lugar, la actividad de AKT1, principal canal involucrado en la toma de K⁺ en raíces (Hirsch *et al.*, 1998, Spalding *et al.*, 1999), no está regulada por *AtQSO2*. Se comprobó que la sobreexpresión de *AtQSO2* en el mutante *akt1-1* reproduce el fenotipo de tolerancia a cationes tóxicos de las líneas con aumento de expresión de *AtQSO2* (Figura 4.50). Por otra parte, no existen diferencias en los niveles de proteína AKT1 en los mutantes afectados en la expresión de *AtQSO2* respecto al control silvestre (Figura 4.48) lo que indica que no existe ninguna regulación transcripcional de AKT1 mediada por *AtQSO2*. Finalmente se realizó la expresión de *AKT1* y *AtQSO2* en una cepa *trk1,2* de levadura donde se observó una tolerancia a cationes tóxicos de la cepa sobreexpresando *AKT1* pero no se observó ninguna mejora en este fenotipo de tolerancia cuando se llevó a cabo la coexpresión de *AKT1* y *AtQSO2* (Figura 4.49). Todos estos resultados indican que AKT1 no interviene en el mecanismo de tolerancia a cationes tóxicos regulado por *AtQSO2*.

En segundo lugar, el potencial de membrana medido en células epidérmicas de raíz tampoco muestra diferencias entre los mutantes y el control silvestre (Tabla V), aunque se observa una ligera depolarización del mutante *par1-ID*. Esta depolarización es apenas significativa y no se reproduce en las líneas transgénicas que sobreexpresan el cDNA de

QSO2. A su vez, una disminución de la expresión y/o actividad de la bomba H^+ -ATPasa de membrana plasmática puede producir una disminución del potencial de membrana (Goossens *et al.*, 2000), pero no se observaron diferencias en los niveles de proteína o en la actividad de la bomba H^+ -ATPasa entre los mutantes y el control silvestre (Figura 4.47).

Finalmente, no existen diferencias en los niveles de acumulación de K^+ en la raíz entre los mutantes de ganancia y disminución de función de *AtQSO2* (Figura 4.23).

5.7 La acumulación de K^+ y cationes tóxicos en el xilema y la parte aérea depende de la expresión de *AtQSO2*

Los resultados de los experimentos de toma de noespermidina y NaCl muestran que la disminución de la expresión de *AtQSO2* conlleva a una mayor toma de estos cationes tóxicos, resultados que son corroborados por una mayor acumulación de Na^+ y noespermidina después de 2 días en medio líquido suplementado con estos cationes tóxicos. En cambio, el mutante *par1-ID* (aumento de expresión de *AtQSO2*) toma y acumula menos Na^+ y noespermidina (Figura 4.19 y 4.20). Con el K^+ sucede lo contrario: el mutante *par1-ID* presenta un aumento en la toma y acumulación de este catión, mientras que la disminución de la expresión de *AtQSO2* implica una menor toma y acumulación de K^+ (Figura 4.22).

En estudios realizados en levaduras, la sobreexpresión de los genes Hal4 y Hal5 (proteínas quinasas reguladoras de Trk1-Trk2) produce tolerancia a cationes tóxicos, debido al aumento de la toma de K^+ que disminuye el potencial de membrana y disminuye la entrada inespecífica de cationes tóxicos (Mulet *et al.*, 1999). Es muy posible que la tolerancia a cationes tóxicos del mutante *par1-ID* sea consecuencia de una mayor toma y acumulación de K^+ . Es decir, un aumento en la toma de K^+ por las células de la epidermis y del córtex de raíz produciría una disminución del potencial de membrana y, por consiguiente, una menor toma inespecífica de cationes tóxicos. Sin embargo, al medir el potencial de membrana en estas células no se observaron diferencias entre los mutantes y el control (Tabla V) por lo que se rechaza esta hipótesis.

Revisando los datos de toma de K^+ , Na^+ y noespermidina se observa una rápida velocidad inicial de toma pero sin diferencias entre los mutantes de ganancia y pérdida de función de *AtQSO2*. En el caso del K^+ y noespermidina, esta rápida velocidad inicial disminuye a partir de los 15 minutos, después de los cuales se mantiene a un nivel constante

para luego aumentar otra vez hasta los 40 minutos aproximadamente. Este tipo de cinética podría indicar que se está produciendo una compartimentación de los cationes en compartimentos intracelulares. Por otro lado, es posible que se produzca una distribución de los cationes entre la raíz y la parte aérea siendo la carga de cationes en el xilema el paso limitante y que genera dicha cinética. Es decir, los cationes tóxicos entran rápidamente en la raíz (velocidad inicial de toma) donde se acumulan (nivel constante de toma) para luego entrar en el xilema y trasladarse a la parte aérea.

El Li^+ no se comporta como el Na^+ y la noespermidina en ensayos de toma y acumulación, ya que existe una diferencia en la velocidad inicial de toma entre los mutantes afectados en la expresión de *AtQSO2*. *par1-1D* presenta una menor velocidad inicial de toma de Li^+ y *par1-2* una velocidad mayor que el control silvestre (Figura 4.21.A), pero después de 2 días no se observan diferencias en la acumulación de Li^+ entre los mutantes (Figura 4.21.B). Es posible que exista un sistema específico de entrada o salida de Li^+ de las células de la raíz el cual sería regulado por *AtQSO2*. Recientemente se ha descubierto que el antiportador *AtNHX8* es específico para Li^+ (An *et al.*, 2007), este antiportador H^+/Li^+ se localiza en la membrana plasmática de células de la raíz y está involucrado en la extrusión de Li^+ de la planta, además su sobreexpresión aumenta la concentración de K^+ en la planta en medio con alta concentración de LiCl (An *et al.*, 2007), por lo que es posible que *AtQSO2* regule la actividad de este antiportador.

La acumulación de Li^+ en plantas con aumento o disminución de expresión de *AtQSO2* no varía (Figura 4.21.B), por lo que este resultado invalidaría la idea planteada anteriormente de una tolerancia relacionada con una menor acumulación de cationes tóxicos. Pero antes de rechazar esta hipótesis se midió la concentración de cationes en la raíz y en la parte aérea de plantas adultas y se obtuvieron resultados que apoyan la idea de que *AtQSO2* estaba implicado en la regulación de la traslocación de cationes tóxicos desde la raíz a la parte aérea.

En la raíz no existen diferencias en la acumulación de K^+ en plantas crecidas sin estrés salino. Cuando las plantas son irrigadas con NaCl se observa un gran aumento de Na^+ y una disminución en la concentración de K^+ en la raíz, pero sin diferencias entre los mutantes de expresión de *AtQSO2* (Figura 4.23.A). La disminución en la concentración de K^+ en estas condiciones puede deberse a un exceso de Na^+ en la raíz que inhibe a los canales de toma de K^+ (Qi y Spalding, 2004). En el caso de plantas irrigadas con LiCl se observa también una disminución en la concentración de K^+ sin que existan diferencias entre los mutantes

afectados en la expresión de *AtQSO2* (Figura 4.23.B), la razón de este fenotipo no es clara y podría deberse a una inhibición de los canales de entrada de K^+ por Li^+ . Un resultado importante fue la menor acumulación de Li^+ en el mutante *par1-ID* comparado con el control silvestre (el mutante *par1-2* no muestra diferencia con el control) que se puede correlacionar con el aumento de la actividad de algún antiportador (como *AtNHX8*) para la extrusión de Li^+ de las células de la raíz, sistema que podría ser regulado directa o indirectamente por *AtQSO2*.

En la parte aérea, en condiciones normales, tenemos una menor concentración de K^+ en el mutante *par1-2* y una mayor concentración en el mutante *par1-ID* y el mutante de sobreexpresión de *AtQSO2* (línea 2) (Figuras 4.24 y 4.29). Estos datos refuerzan la idea de que la traslocación de K^+ a la parte aérea es un paso regulado por *AtQSO2*. En el caso de plantas irrigadas con NaCl se observa un menor contenido de K^+ en los mutantes y *Col-7* comparado con condiciones normales. Esta disminución puede ser debida a una menor toma de K^+ en la raíz debido a un exceso de Na^+ (Qi y Spalding, 2004) lo cual directamente produce una menor acumulación de K^+ en toda la planta. Con respecto al Na^+ en condiciones normales, se observa una menor concentración de Na^+ en el mutante *par1-ID* y la línea 2, aunque no se observan diferencias significativas entre el mutante *par1-2* y *Col-7*, posiblemente debido a que la toma de Na^+ es más lenta en las plantas crecidas en tierra comparada con medio líquido (Figura 4.20.B), ya que las plantas no están en contacto directo con la solución nutritiva suplementada con NaCl y por otro lado los experimentos fueron llevados a cabo en condiciones de baja transpiración.

En los experimentos realizados regando las plantas con LiCl (Figuras 4.24.B y 4.29.B) se observa una disminución en la concentración de K^+ ; el Li^+ provoca una pérdida del K^+ en la parte aérea de forma similar en los mutantes y el control silvestre. Este fenotipo se presenta también en tabaco donde plantas irrigadas con LiCl muestran una drástica reducción en la concentración de K^+ después de 3 días (Naranjo *et al.*, 2003). Una posible explicación es que el Li^+ inhiba la toma de K^+ en la raíz, como se comentó anteriormente, otra posibilidad es que el Li^+ inhiba algún canal encargado de la carga de K^+ en el xilema. Pero los datos más importantes de este experimento son los referentes a la concentración de Li^+ en la parte aérea, ya que a diferencia del experimento en medio líquido (Figura 4.21.B) en este caso sí se observa una mayor toma de Li^+ en el mutante *par1-2* y una menor toma en el mutante *par1-ID* y línea 2 comparado con el control silvestre (Figuras 4.24.B y 4.29.B). Estos resultados,

añadidos a los obtenidos en el caso de Na^+ y norespermidina, apoyan la hipótesis de que la mayor tolerancia a cationes tóxicos del mutante *par1-ID* está basada en una menor toma de estos cationes.

El mutante *par1-2* presenta una menor acumulación de K^+ en la parte aérea pero no tiene afectada la acumulación de K^+ en la raíz. Este fenotipo es idéntico al del mutante *skor1*, deficiente en un canal de carga de K^+ en el xilema (Gaymard *et al.*, 1998). Aparentemente existen mecanismos reguladores (inhibición de la entrada de K^+) que mantienen los niveles radiculares de K^+ al inhibirse la salida al xilema de este catión. La misma interpretación podría darse a la observación de que el mutante *par1-2* acumula mayor cantidad de Na^+ en la parte aérea pero no presenta diferencias en la raíz.

Otros mutantes afectados en la carga/descarga de Na^+ al xilema (*hkt1* y *sos1*) sí presentan cambios en los niveles de Na^+ en raíz (Davenport *et al.*, 2007). Sin embargo estos transportadores funcionan también en otras zonas de la raíz: epidermis en el caso de SOS1 (Shi *et al.*, 2002) y floema en el caso de HKT1 (Berthomieu *et al.*, 2003). Por tanto, las variaciones en el contenido de Na^+ en la raíz en estos mutantes puede deberse a estas otras actividades distintas a la carga/descarga del xilema.

Finalmente, para comprobar que la traslocación de cationes desde la raíz a la parte aérea, es decir la carga de cationes de la raíz en el xilema, es un paso importante en la tolerancia a cationes tóxicos, se midió el contenido de K^+ , Na^+ y Li^+ en el xilema de plantas irrigadas con LiCl y NaCl (Figura 4.25) Con este experimento se observó que el mutante resistente a cationes tóxicos *par1-ID* presenta mayor contenido de K^+ y menor contenido de Na^+ y Li^+ en el xilema que el control silvestre, en cambio, el mutante sensible a cationes tóxicos *par1-2* presenta unos valores totalmente opuestos a los de *par1-ID*. Y más significativo aún es observar que la diferencia en la concentración de K^+ en el xilema entre los mutantes *par1-ID* y *par1-2* se mantiene en plantas irrigadas con NaCl y LiCl .

Como resumen tenemos que las líneas de sobreexpresión de *AtQSO2* (*par1-ID* y línea 2) acumulan una mayor cantidad de K^+ en la parte aérea y una menor cantidad de Na^+ y Li^+ en condiciones de estrés salino. Por el contrario, el mutante con una disminución en la expresión de *AtQSO2* (*par1-2*) acumula menos K^+ y una mayor cantidad de Na^+ y Li^+ en la parte aérea (Figura 5.1). Sin embargo, en la raíz no se observan diferencias entre los mutantes afectados en la expresión de *AtQSO2* y el control silvestre. Por lo que el fenotipo de tolerancia a

cationes tóxicos de los mutantes de sobreexpresión de *AtQSO2* se debe a la menor traslocación de estos cationes desde la raíz a la parte aérea, paso regulado como consecuencia de una mayor carga de K^+ en el xilema. Por lo tanto, la carga del xilema con K^+ (regulada por *AtQSO2*) parece ser la clave en la tolerancia a cationes tóxicos en el mutante *par1-1D*.

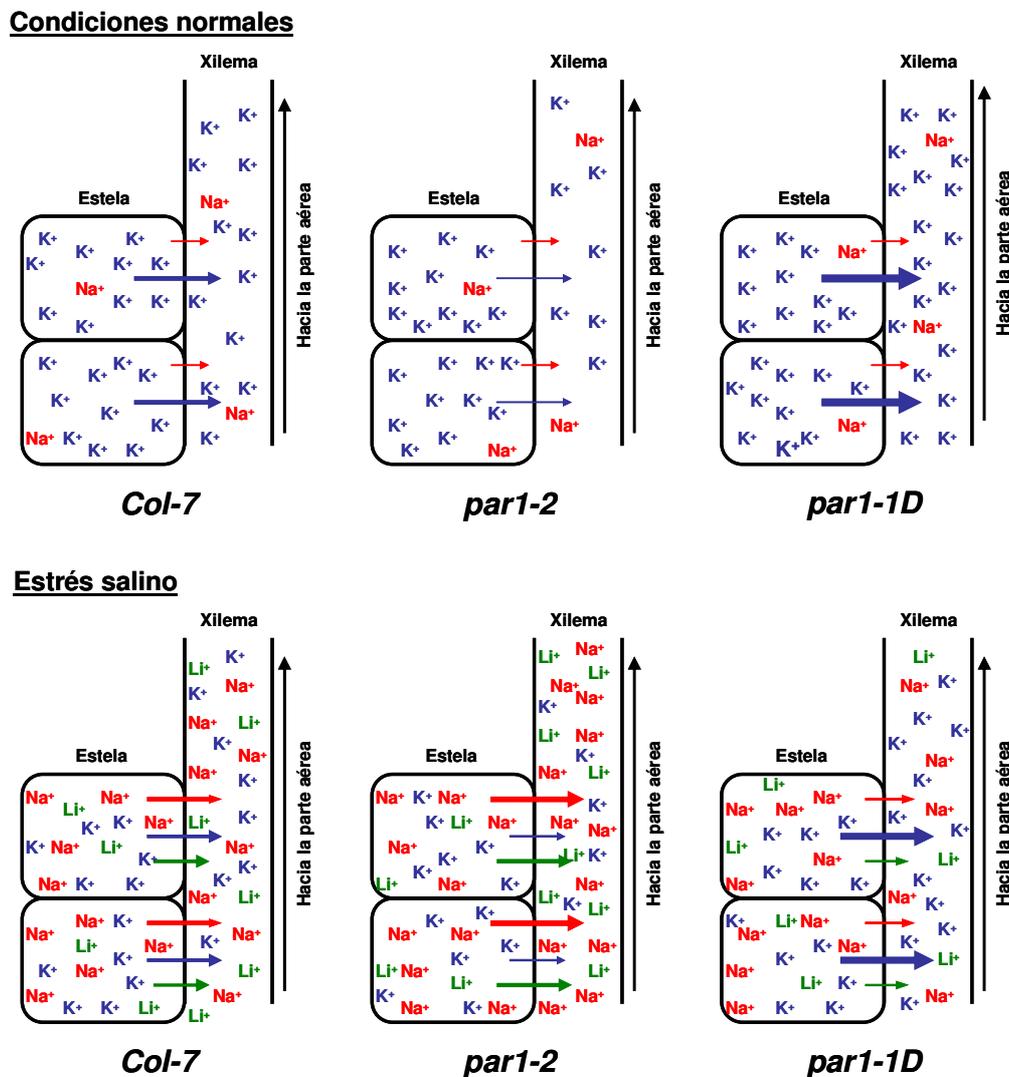


Figura 5.1 Esquema de la acumulación de cationes en los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de la expresión de *AtQSO2* en condiciones normales y estrés salino. Los colores de las flechas corresponden a los colores de los cationes y el grosor de las flechas indica la cantidad de carga del catione, es decir, una flecha más ancha corresponde a una mayor carga del catione en el xilema. Las concentraciones de K^+ , Na^+ , y Li^+ en la estela y en el xilema son orientativas. Varias capas de células de la estela son representadas por una sola célula.

5.8 Un modelo para la tolerancia a cationes tóxicos regulado por *AtQSO2*

Se ha demostrado que *AtQSO2* regula el transporte de K^+ entre la raíz y la parte aérea por lo que *AtQSO2* debe regular algún sistema de carga de K^+ en el xilema, este sistema

consistiría en algún canal o transportador de membrana ubicado en las células del parénquima del xilema (células de la estela) que se encargaría de descargar el K^+ en el apoplasto y a partir de ahí pasar por difusión al xilema (Figura 5.2). La carga de K^+ en el xilema puede involucrar sistemas de transporte activo (Lacan y Durand, 1996) y/o sistemas de difusión pasiva mediante canales (Taiz y Zeiger, 2002). Un aumento o disminución en la concentración de K^+ en el apoplasto de la estela sería el motivo principal de la tolerancia o sensibilidad, respectivamente, a cationes tóxicos.

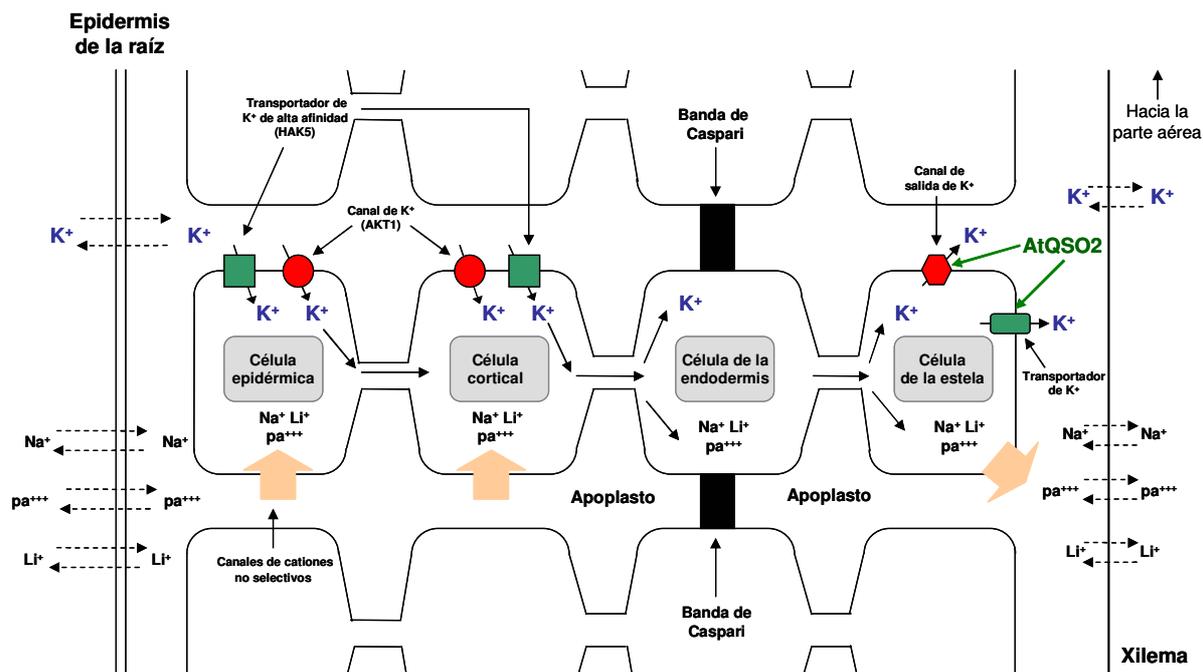


Figura 5.2 Flujo de cationes desde el exterior de la raíz al xilema y posibles sistemas regulados por AtQSO2. Las flechas con líneas punteadas indican un movimiento de cationes libre a través de la membrana. Los canales se muestran en color rojo, los transportadores en color verde y sistemas inespecíficos de entrada de cationes en naranja. Diferentes capas de células son representadas por una sola célula. pa: poliaminas.

Se conoce por experimentos realizados en levaduras que el K^+ (junto con H^+) regula el potencial de membrana (Mulet *et al.*, 1999) por lo que se propone que una mayor acumulación de K^+ en el apoplasto produce, de una forma indirecta, una menor traslocación de cationes tóxicos a la parte aérea mediante un aumento del potencial de membrana de las células de la estela que rodean al xilema. Un aumento del potencial de membrana disminuye la salida pasiva de cationes a través de canales produciendo una menor descarga de cationes tóxicos de la raíz al xilema, por consiguiente en este trabajo se propone el siguiente modelo de tolerancia a cationes tóxicos regulado por AtQSO2 (Figura 5.3). Como se ha mencionado anteriormente, el gen AtQSO2 se expresa en todos los tejidos de la raíz y según el modelo

propuesto, el canal o transportador de carga de K^+ en el xilema regulado por *AtQSO2* se debe de ubicar solamente en las células que rodean al xilema. Por tanto los mutantes de ganancia y pérdida de expresión de *AtQSO2* solo tendrán afectado el potencial de membrana en las células que rodean al xilema y no en las células del resto de tejidos de la raíz.

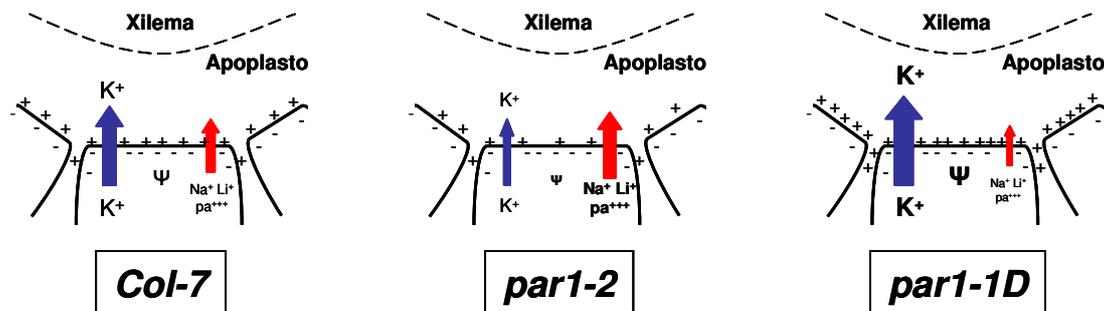


Figura 5.3 Modelo de tolerancia a cationes tóxicos basado en el potencial de membrana de los mutantes con ganancia (*par1-1D*) y disminución (*par1-2*) de la expresión de *AtQSO2* en condiciones de estrés salino. La flecha azul corresponde al transporte de K^+ y la flecha roja corresponde al transporte inespecífico de cationes tóxicos. El grosor de las flechas y el tamaño de los símbolos de los cationes indican la cantidad de carga de los cationes, es decir, una flecha más ancha o una letra más grande corresponden a una mayor carga del catión en el apoplasto. La línea discontinua entre el xilema y el apoplasto indica que existe un paso libre de los cationes entre los 2 compartimentos. Ψ : potencial de membrana, un tamaño de letra mayor o menor corresponde a un aumento o disminución del potencial de membrana, respectivamente. pa: poliaminas.

Según el modelo propuesto, es necesario identificar algún canal o transportador de K^+ ubicado en las células que rodean al xilema que sea regulado por *AtQSO2*. El principal candidato es el canal rectificador de salida de K^+ SKOR (Gaymard *et al.*, 1998) que se ubica en las células de raíz que rodean al xilema y está implicado en la carga de K^+ en el xilema. El mutante de pérdida de función *skor1* presenta un menor contenido de K^+ en la parte aérea y en el xilema (Gaymard *et al.*, 1998) de manera similar al mutante *par1-2* (disminución de función de *AtQSO2*). Además el mutante *skor1-2* presenta una mayor sensibilidad a cationes tóxicos que el mutante *par1-2* (Figura 4.51), por lo que es posible que SKOR y *AtQSO2* estén implicados en la misma ruta de carga de K^+ en el xilema.

Pero cuando se realizó la sobreexpresión de *AtQSO2* en el fondo genético *skor1-2* se observó un ligero aumento en la tolerancia a cationes tóxicos pero sin alcanzar los valores del control silvestre (Figura 4.52). Estos resultados muestran, en primer lugar, que pueden existir varios sistemas involucrados en la carga de K^+ en el xilema que sean regulados por *AtQSO2* (entre ellos SKOR), ya que las líneas sobreexpresando *AtQSO2* muestran una leve tolerancia a cationes tóxicos comparado con el mutante *skor1-2*, pero sin llegar a ser más tolerante que el control silvestre, cosa que ocurre al sobreexpresar *AtQSO2* en *Col-7* y en un mutante *akt1-1*

(Figuras 4.27 y 4.50). En segundo lugar, la sobreexpresión de *AtQSO2* en un mutante *skor1-2* mejora el crecimiento en bajo potasio, lo que implica un aumento en la carga del K^+ en el xilema por lo que deben de existir otros sistemas de carga de K^+ en el xilema/apoplasto aparte de SKOR. Este dato era de esperar ya que el mutante *skor1* es viable y presenta una pérdida del 50% aproximadamente de K^+ en la parte aérea comparado con el control (Gaymard *et al.*, 1998) con lo que el otro 50% debe de ser traslocado a la parte aérea por otros sistemas. Pero este aumento en la carga de K^+ en el xilema/apoplasto en el mutante *skor1-2* debida a la sobreexpresión de *AtQSO2* tan solo provoca una leve mejora en la tolerancia a cationes tóxicos, lo que quiere decir que, o bien las plántulas están muy afectadas por la pérdida de SKOR o que el aumento de la carga de K^+ que permite mejorar el crecimiento en bajo potasio no es suficiente para generar un cambio notable en el potencial de membrana; cambio que sí se daría si estuviera presente SKOR.

Como hemos visto, parece que *AtQSO2* no solo actuaría a través de SKOR sino que también podría regular otro sistema de carga de K^+ en el xilema; es decir, *AtQSO2* podría regular la actividad de diferentes transportadores, como en el caso de la proteína KAB1 que se une a KAT1 y AKT1 (Tang *et al.*, 1996, Tang *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1999) y AtKC1 que interacciona con AKT1 y AKT2 regulando su función (Pilot *et al.*, 2003, Obrdlik *et al.*, 2004). Es importante mencionar que aunque la proteína SKOR no presente cisteínas en alguna horquilla exterior, es posible que su regulación por *AtQSO2* sea indirecta, es decir que *AtQSO2* interaccione con alguna proteína que ayude a la estabilidad y/o función de SKOR, como el caso de AKT1 que es regulado por AtKC1 (Ashley *et al.*, 2006).

Basándose en los canales y transportadores de K^+ conocidos hasta el momento en *Arabidopsis* se pueden sugerir algunos candidatos a ser regulados por *AtQSO2*. En primer lugar, tenemos a la proteína GORK. Esta proteína es un canal de salida de K^+ , al igual que SKOR, ubicado principalmente en las células oclusivas (Ache *et al.*, 2000), pero también se expresa en raíz, aunque su ubicación se centra en las células de la epidermis donde interviene en la salida de K^+ de la planta (Very y Sentenac, 2003) por lo que no parece involucrado en la carga de K^+ en el xilema/apoplasto. El canal AtTPK4 también funciona como un canal de salida de K^+ de membrana plasmática pero se expresa principalmente en polen, no observándose expresión en raíces según la base de datos AREX (www.arexdb.org). Dentro de la familia CPA2 de antiportadores catión:protón de *Arabidopsis* tenemos 6 transportadores KEA (KEA1-6), que por su homología con los transportadores bacterianos Kef se ha propuesto que son antiportadores K^+/H^+ , estos antiportadores KEA se ubican en varios tejidos

de la planta incluyendo la raíz (Sze *et al.*, 2004) y podrían estar involucrados en la carga de K^+ al xilema/apoplasto, ya que los transportadores bacterianos Kef están involucrados en la salida de K^+ de la célula (Ferguson, 1999). Sin embargo, analizando la secuencia de estas proteínas mediante el programa TransportDB (www.membranetransport.org) se observa que KEA1 y KEA2 no presentan cisteínas en ninguna horquilla exterior entre segmentos transmembrana por lo que AtQSO2 no puede tener como sustrato directo a estas dos proteínas. Las proteínas KEA3-6 sí presentan al menos una cisteína en las horquillas exteriores pero su ubicación en la raíz, según el programa AREX, corresponde en su mayoría a la epidermis, córtex y endodermis, teniendo poca expresión en periciclo y estela. Además, al ser los transportadores KEA proteínas antiportadoras K^+/H^+ , una mayor salida de K^+ implica una cantidad igual de entrada de H^+ por lo que el potencial de membrana no variaría, aunque no se puede descartar que los transportadores KEA sean electrogénicos.

En el caso de los transportadores KUP, utilizando la base de datos TransportDB podemos observar que de los 13 transportadores KUP, 4 no presentan cisteínas en ninguna horquilla exterior (KUP6, KUP7, KUP8 y HAK5); además, KUP9 y KUP12 no transportan K^+ y KUP11 presenta una expresión muy débil en raíz (Ahn *et al.*, 2004). Por lo que tenemos que los transportadores KUP1-5 y KUP10 presentan al menos una cisteína en una horquilla exterior y se ubican en raíz, pero analizando más en detalle el patrón de expresión de estos transportadores usando la base de datos AREX se aprecia que solo KUP10 se expresa principalmente en las células de la estela y periciclo, con un patrón de expresión muy parecido a SKOR. Además KUP 10 presenta dos cisteína entre los TMS 7°-8° y 9°-10°, por lo que parece un candidato muy probable para ser regulado por AtQSO2.

Dentro de los canales de tipo CNGC, tenemos 5 canales que transportan K^+ : AtCNGC1-4 y AtCNGC10. Un dato importante es que estos 5 canales (y la mayoría de la familia AtCNGC) presentan 4 cisteínas conservadas entre el 5° TMS y el poro (Kohler *et al.*, 1999), que al estar situadas en la horquilla exterior podrían funcionar como un motivo regulador. Pero analizando individualmente cada canal tenemos que AtCNGC4 no se expresa en raíz (Talke *et al.*, 2003) y AtCNGC3 es un canal no selectivo que permite también la entrada de Na^+ , además de estar ubicado principalmente en el córtex y epidermis de la raíz (Gobert *et al.*, 2006). AtCNGC1 se expresa en la estela y periciclo (www.arexdb.org) pero al igual que AtCNGC3 también permite la entrada de Na^+ (Hua., *et al* 2003). AtCNGC2 se ubica en el periciclo y estela y además es selectivo para K^+ sobre el Na^+ (Leng *et al.*, 2002, Hua *et al.*, 2003), pero recientemente se ha publicado que AtCNGC2 está implicado en la toma de

Ca²⁺ para la producción de óxido nítrico en la respuesta inmune de la planta a patógenos (Ali *et al.*, 2007). Finalmente tenemos como principal candidato a ser regulado por AtQSO2 al canal AtCNGC10 que se expresa en la estela y periciclo (www.arexdb.org). Su sobreexpresión rescata parcialmente el fenotipo de sensibilidad en bajo potasio de *akt1* y su pérdida de función lleva a una drástica disminución del crecimiento y concentración de K⁺ en la planta (Li *et al.*, 2005, Borsics *et al.*, 2007).

Estos 2 posibles candidatos, KUP10 y CNGC10 cumplen las 3 características deseadas: transportan K⁺, presentan cisteínas en horquillas exteriores y se ubican en la estela y/o periciclo. La presencia de cisteínas es fundamental para que estas proteínas puedan ser dianas de AtQSO2. De hecho la formación de puentes disulfuro intramoleculares es un mecanismo de regulación enzimático muy común observado en plantas. Por ejemplo, la 5' adenil sulfato (APS) reductasa que interviene en la asimilación de sulfato produciendo cisteína y glutatión es activada por la formación de un enlace disulfuro (Bick *et al.*, 2001). También la glutamato cisteína liasa (GCL), que cataliza la biosíntesis de glutatión, es regulada por la oxidación y reducción de enlaces disulfuro (Hothorn *et al.*, 2006). Finalmente, muchas enzimas funcionan como heterómeros y la unión entre los diferentes monómeros, para formar la estructura cuaternaria, se realiza mediante puentes disulfuro. Así, en las oxidasas alternativas de plantas (AOXs) que participan en la vía alternativa de respiración celular (Siedow y Umbach, 1995), la regulación de su actividad depende de la formación de puentes disulfuro entre los 2 monómeros (Rhoads *et al.*, 1998, Umbach *et al.*, 2006).

Es probable que KUP10 y CNGC10 puedan formar heterómeros como ocurre en el caso de otros transportadores de membrana como la ATPasa (Arango *et al.*, 2003). Se ha propuesto que los transportadores AtCNGC pueden formar tetrámeros (Hua *et al.*, 2003). Entonces KUP10 y CNGC10 pueden ser regulados por AtQSO2 formando puentes disulfuro intramoleculares o entre monómeros y estos puentes disulfuro regularían la actividad de estos transportadores que al estar ubicados en la estela y transportar K⁺ podrían contribuir a la traslocación de K⁺ desde la raíz a la parte aérea mediante la carga de K⁺ desde la estela al apoplasto/xilema.

Por último, existe un antiportador Na⁺/H⁺ llamado SOS1 (Wu *et al.*, 1996) que es electroneutro y transporta Na⁺ fuera de la célula (Qiu *et al.*, 2003), este antiportador se ubica en la estela de la raíz (Shi *et al.*, 2002) y presenta una cisteína, en una horquilla exterior, entre el 3º y 4º TMS. Anteriormente se había demostrado que SOS1 no transporta K⁺, pero

recientemente se ha publicado que SOS1 puede transportar K^+ cuando se expresa en un mutante de *E. coli* deficiente en la toma de K^+ (Garcia-deblas *et al.*, 2006), por lo tanto existe la posibilidad de que SOS1 pueda sacar K^+ de la célula en determinadas condiciones y que este transporte sea regulado por AtQSO2.

Conclusiones

1. La poliamina noespermidina se puede emplear a bajas concentraciones como un agente de selección para encontrar mutantes resistentes a cationes tóxicos, sin producir ningún efecto osmótico en el medio de selección.
2. *par1-1D* es un mutante dominante con un fenotipo pleiotrópico de resistencia a cationes tóxicos (noespermidina, espermidina, NaCl, LiCl), además presenta una integración compleja de T-DNA en el *locus* At1g15030 y este T-DNA está ligado al fenotipo de tolerancia a noespermidina.
3. El fenotipo pleiotrópico de resistencia a cationes tóxicos del mutante *par1-1D* es debido al aumento de expresión del gen *AtQSO2* (*locus* At1g15020). Por el contrario, la pérdida o disminución de la expresión del gen *AtQSO2* produce un fenotipo pleiotrópico de sensibilidad a cationes tóxicos.
4. El gen *AtQSO2* codifica una proteína de 55 kDa perteneciente a la familia QSOX con actividad sulfidril oxidasa que se expresa principalmente en raíz. Esta proteína se encuentra en la matriz extracelular y se ubica tanto en la matriz extracelular como en el citoplasma.
5. La proteína AtQSO1 presenta un 76% de homología con AtQSO2 y se expresa también en raíz, pero su papel fisiológico es diferente debido a que los mutantes de pérdida de función de *AtQSO1* no presentan fenotipo de sensibilidad a cationes tóxicos, mientras que los mutantes de pérdida o disminución de expresión de *AtQSO2* son sensibles a bajo potasio y cationes tóxicos. Además el gen *AtQSO2* se induce en condiciones de bajo potasio mientras que el gen *AtQSO1* se reprime levemente en estas condiciones.

6. El potencial de membrana de células epidérmicas de raíz no varía entre los mutantes de aumento o disminución de expresión de *AtQSO2* y el control silvestre.
7. Existe un aumento en la acumulación de K^+ y una disminución de Na^+ y Li^+ en el xilema y la parte aérea, en condiciones de estrés, en el mutante con un aumento de la expresión de *AtQSO2* (*par1-1D*). Por el contrario, el mutante con una disminución de la expresión de *AtQSO2* (*par1-2*) acumula menos K^+ y una mayor cantidad de Na^+ y Li^+ .
8. El fenotipo de tolerancia a cationes tóxicos debido a la sobreexpresión de *AtQSO2* es independiente del canal de entrada de K^+ AKT1 y parcialmente dependiente del canal de salida de K^+ SKOR.
9. El aumento de expresión de *AtQSO2* produce un aumento de la carga de K^+ en el xilema mediante la regulación positiva de algún sistema de transporte de K^+ desde la raíz al xilema, esto produce un aumento en el potencial de membrana de las células de la estela disminuyendo así la descarga pasiva de cationes tóxicos desde la raíz al xilema.

Bibliografía

- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR and Hedrich R. (2000)** GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Lett.* 486: 93-98.
- Aharon GS, Apse MP, Duan SL, Hua XJ and Blumwald E. (2003)** Characterization of a family of vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* 253: 245-256.
- Ahn SJ, Shin R and Schachtman DP. (2004)** Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K⁺ uptake. *Plant Physiol.* 134: 1135-1145.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. (2002)** Molecular Biology of the Cell. Garland Science.
- Alexandratos N. (1999)** World food and agriculture: outlook for the medium and longer term. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5908-5914
- Ali R, Zielinski RE and Berkowitz GA. (2006)** Expression of plant cyclic nucleotide-gated cation channels in yeast. *J. Exp. Bot.* 57: 125-138.
- Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S and Berkowitz GA. (2007)** Death Don't Have No Mercy and Neither Does Calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and Innate Immunity. *Plant Cell.* 3: 1081-1095.
- Allen GJ, Muir SR and Sanders D. (1995)** Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP3 and cyclic ADP-ribose. *Science.* 268: 735-737.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadriab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC and Ecker JR. (2003)** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 301: 653-657.
- Amiot C, Musard JF, Hadjiyiassemis M, Jouvenot M, Fellmann D, Risold PY and Adami P. (2004)** Expression of the secreted FAD-dependent sulfhydryl oxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 125: 13-21.
- Amtmann A and Sanders D. (1999)** Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29: 75-112.
- An R, Chen QJ, Chai MF, Lu PL, Su Z, Qin ZX, Chen J and Wang XC. (2007)** AtNHX8, a member of the monovalent cation:proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li/H antiporter. *Plant J.* 49: 718-728.
- Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ and Gaber RF. (1992)** Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3736-3740.
- Apel K and Hirt H. (2004)** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA and Blumwald E. (1999)** Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science.* 285: 1256-1258.
- Apse MP and Blumwald E. (2002)** Engineering salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 146-150.
- Apse MP, Sottosanto JB and Blumwald E. (2003)** Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of *AtNHX1*, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant J.* 36: 229-239.

- Arango M, Gevaudant F, Oufattole M and Boutry M. (2003)** The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta*. 216: 355-365.
- Arazi T, Kaplan B and Fromm H. (2000)** A high-affinity calmodulin-binding site in a tobacco plasma-membrane channel protein coincides with a characteristic element of cyclic nucleotide-binding domains. *Plant Mol. Biol.* 42: 591-601.
- Armengaud P, Breitling R and Amtmann A. (2004)** The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signalling. *Plant Physiol.* 136: 2556-2576.
- Armstrong F, Leung J, Grabov A, Brearley J, Giraudat J and Blatt MR. (1995)** Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K⁺ channels is suppressed by *abi1.1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 9520-9524.
- Ashley MK, Grant M and Grabov A. (2006)** Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *J. Exp. Bot.* 57: 425-436.
- Ashraf M. (1994)** Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 17-42
- Ashraf M and O'Leary JW. (1994)** Ion distribution in leaves of varying age in salt-tolerant lines of alfalfa under salt stress. *J. Plant Nutr.* 17: 1463-1476.
- Askari H, Edqvist J, Hajheidari M, Kafi M and Salekdeh GH. (2006)** Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics.* 6: 2542-2554.
- Bagni N, Ruiz-Carrasco K, Franceschetti M, Fornale S, Fornasiero RB and Tassoni A. (2006)** Polyamine metabolism and biosynthetic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 776-786.
- Baker MA and Aitken RJ. (2004)** The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol. Cell Endocrinol.* 216: 47-54.
- Balague C, Lin B, Alcon C, Flottes G, Malmstrom S, Kohler C, Neuhaus G, Pelletier G, Gaymard F and Roby D. (2003)** HLM1, an essential signalling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* 15: 365-379.
- Bañuelos MA, Klein RD, Alexander-Bowman SJ and Rodríguez-Navarro A. (1995)** A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.* 14: 3021-3027
- Bañuelos MA, Garciadeblas B, Cubero B and Rodríguez-Navarro A. (2002).** Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol.* 130: 784-94
- Barbier-Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, Ephritikhine G, Frachisse J and Maurel C. (2000)** Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465: 199-218.
- Bardwell JC. (1994)** Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol. Microbiol.* 14: 199-205.
- Becker D, Geiger D, Dunkel M, Roller A, Bertl A, Latz A, Carpaneto A, Dietrich P, Roelfsema MR, Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Czempinski K and Hedrich R. (2004)** AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 15621-15626.
- Benayoun B, Esnard-Fève A, Castella S, Courty Y and Esnard F. (2001)** Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. *J. Biol. Chem.* 276: 13830-13837.
- Benlloch M, Moreno I and Rodríguez-Navarro A. (1989)** Two Modes of Rubidium Uptake in Sunflower Plants. *Plant Physiol.* 90: 939-942.

- Bennett J and Khush GS. (2003)** Enhancing Salt Tolerance in Crops Through Molecular Breeding: A New Strategy, pp 15-51 En: Crop Production in Saline Environments. Editors: Goyal SS, Sharma SK and Rains W. Food Product Press
- Bent AF. (2000)** *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* 124: 1540-1547.
- Bergmann M, Kumari M, Aumüller G, Hoffmann K and Seitz J. (1990)** Distribution pattern of testicular sulphhydryloxidase immuno-activity in the djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) during photoperiodically induced involution and recrudescence. *Int. J. Androl.* 13: 488-499.
- Bergmann M, Aumüller G, Seitz J and Nieschlag E (1992)** Sulphydryl oxidase immunoreactivity in seminiferous tubules of infertile men. *Cell Tissue Res.* 267: 209-214.
- Berkowitz GA, Zhang X, Mercier R, Leng Q and Lawton M. (2000)** Co-expression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K⁺ channel KAT1 alters current parameters in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Cell Physiol.* 41: 785-790.
- Berthomieu P, Conejero G, Nublát A, Brackenbury WJ, Lambert C, Savio C, Uozumi N, Oiki S, Yamada K, Cellier F, Gosti F, Simonneau T, Essah PA, Tester M, Veyrier AA, Sentenac H and Casse F. (2003)** Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22: 2004-2014.
- Bevan M. (1984)** Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic. Acids Res.* 12: 8711-8721.
- Bick JA, Setterdahl AT, Knaff DB, Chen Y, Pitcher LH, Zilinskas BA and Leustek T. (2001)** Regulation of the plant-type 5'-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress. *Biochemistry.* 40: 9040-9048.
- Bihler H, Eing C, Hebeisen S, Roller A, Czempinski K and Bertl A. (2005)** TPK1 is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel. *Plant Physiol.* 139: 417-424.
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW and Benfey PN. (2003)** A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science.* 302: 1956-1960.
- Blatt MR. (2000)** Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 221-241.
- Blumwald E. (2000)** Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 431-434.
- Bohnert HJ, Nelson DE and Jensen RG. (1995)** Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell.* 7: 1099-1111.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C and Minibayeva F. (2002)** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53: 1367-1376.
- Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA and Lamb C. (2000)** Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell.* 12:2383-2394.
- Borsani O, Cuartero J, Fernandez JA, Valpuesta V and Botella MA. (2001)** Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *Plant Cell.* 13: 873-887.
- Borsics T, Webb D, Andeme-Ondzighi C, Staehelin LA and Christopher DA. (2007)** The cyclic nucleotide-gated calmodulin-binding channel AtCNGC10 localizes to the plasma membrane and influences numerous growth responses and starch accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 225: 563-573.
- Bradford MM. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Breckle SW. (2002)** Salinity, Halophytes and Salt Affected Natural Ecosystems, pp 53-77. En: Salinity: Environment-Plant-Molecules. Editors: Läuchli A. and Lüttge U. Kluwer Academic Publishers.
- Bruns S and Hecht-Buchholz C. (1990)** Light and electron-microscope studies on the leaves of several potato cultivars after application of salt at various developmental stages. *Potato Res.* 33: 33-41.
- Burnette WN. (1981)** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal.Biochem.* 112: 195-203.
- BursSENS S, Himanen K, van de Cotte B, Beeckman T, Van Montagu M, Inze D and Verbruggen N. (2000)** Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 211: 632-640.
- Buschmann PH, Vaidyanathan R, Gassmann W and Schroeder JI. (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: 1387-1397.
- Cabibbo A, Pagani M, Fabbri M, Rocchi M, Farmery MR, Bulleid NJ and Sitia R. (2000)** ERO1-L, a human protein that favors disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 275: 4827-4833.
- Caird MA, Richards JH and Donovan LA. (2007)** Nighttime stomatal conductance and transpiration in C3 and C4 plants. *Plant Physiol.* 143: 4-10
- Cao Y, Ward JM, Kelly WB, Ichida AM, Gaber RF, Anderson JA, Uozumi N, Schroeder JI and Crawford NM. (1995)** Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 109: 1093-1106.
- Cavalcanti FR, Santos Lima JP, Ferreira-Silva SL, Viegas RA and Silveira JA. (2007)** Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. *J Plant Physiol.* 164: 591-600
- Cellier F, Conejero G, Ricaud L, Luu DT, Lepetit M, Gosti F and Casse F. (2004)** Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis. *Plant J.* 39: 834-846.
- Chao DY, Luo YH, Shi M, Luo D and Lin HX. (2005)** Salt-responsive genes in rice revealed by cDNA microarray analysis. *Cell Res.* 15: 796-810.
- Chauhan S, Forsthoefel N, Ran Y, Quigley F, Nelson DE and Bohnert HJ. (2000)** Na⁺/myo-inositol symporters and Na⁺/H⁺-antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* 24: 511-522.
- Chen Z, Newman I, Zhou M, Mendham N, Zhang G and Shabala S. (2005)** Screening plants for salt tolerance by measuring K⁺ flux: a case study for barley. *Plant Cell Environ.* 28: 1230-1246.
- Cheng NH, Pittman JK, Zhu JK and Hirschi KD. (2004)** The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J. Biol. Chem.* 279: 2922-2926.
- Cheong YH, Kim KN, Pandey GK, Gupta R, Grant JJ and Luan S. (2003)** CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 15: 1833-1845.
- Cherel I, Michard E, Platet N, Mouline K, Alcon C, Sentenac H and Thibaud J-B. (2002)** Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K⁺ channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell.* 14: 1133-1146.
- Cherel I. (2004)** Regulation of K⁺ channel activities in plants: from physiological to molecular aspects. *J. Exp. Bot.* 55: 337-351.
- Chinnusamy V, Schumaker K and Zhu JK. (2004)** Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 55: 225-236.

- Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H and Sheen J. (1996)** Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6: 325-330.
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y and Grill E. (2006)** Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol (Stuttg)*. 8: 314-325.
- Christou P. (2002)** No credible scientific evidence is presented to support claims that transgenic DNA was introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Transgenic Res.* 11: iii-v.
- Christou P, Capell T, Kohli A, Gatehouse JA and Gatehouse AM. (2006)** Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends Plant. Sci.* 11: 302-308.
- Clarkson DT and Hanson JB. (1986)** Proton fluxes and the activity of a stelar proton pump in onion roots. *J. Exp. Bot.* 37: 1136-1150.
- Coppock DL, Kopman C, Scandalis S and Gilleran S. (1993)** Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ.* 4: 483-493.
- Coppock DL, Cina-Poppe D and Gilleran S. (1998)** The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. *Genomics.* 54: 460-468.
- Coppock D, Kopman C, Gudas J and Cina-Poppe DA (2000)** Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 604-610
- Coppock DL and Thorpe C. (2006)** Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid. Redox Signal.* 8: 300-311.
- Cramer G. (2002)** Sodium-calcium interactions under salinity stress, pp 205-227 En: Salinity: Environment-Plant-Molecules. Editors: Läuchli A. and Lüttge U. Kluwer Academic Publishers.
- Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T and Müller-Röber B. (1997)** New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *EMBO Journal* 16: 2565-2575.
- Czempinski K, Weigmann N, Zimmermann S and Müller-Röber B. (1999)** Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *J. Exp. Bot.* 50: 955-966.
- Czempinski K, Frachisse JM, Maurel C, Barbier-Brygoo H and Müller-Röber B. (2002)** Vacuolar membrane localization of the *Arabidopsis* 'two-pore' K⁺ channel KCO1. *Plant J.* 29: 809-820.
- Daniell H. (2006)** Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol. J.* 1: 1071-1079.
- Daram P, Urbach S, Gaymard F, Sentenac H and Chérel I. (1997)** Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *EMBO J.* 16: 3455-3463.
- Dauphin A, El Maarouf H, Vienney N, Rona JP and Bouteau F. (2001)** Effect of desiccation on potassium and anion currents from young root hairs: Implication on tip growth. *Physiol. Plant.* 113: 79-84.
- Davenport RJ, Munoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A and Tester M. (2007)** The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 30: 497-507.
- Deeken R, Geiger D, Fromm J, Koroleva O, Ache P, Langenfeld-Heyser R, Sauer N, May ST and Hedrich R. (2002)** Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta.* 216: 334-344.
- Deeken R, Ivashikina N, Czirjak T, Philippar K, Becker D, Ache P and Hedrich R. (2003)** Tumour development in *Arabidopsis thaliana* involves the Shaker-like K⁺ channels AKT1 and AKT2/3. *Plant J.* 34: 778-787.

- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M and Barroso JB. (2002)** Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisome. *J. Exp. Bot.* 53: 1255-1272.
- Dellapenna D. (2005)** Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends Plant. Sci.* 10: 574-579.
- Demidchik V, Davenport RJ and Tester M. (2002)** Nonselective cation channels in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 67-107.
- Dennison KL, Robertson WR, Lewis BD, Hirsch RE, Sussman MR and Spalding EP. (2001)** Functions of AKT1 and AKT2 potassium channels determined by studies of single and double mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 1012-1019.
- Desbrosses G, Josefsson C, Rigas S, Hatzopoulos P and Dolan L. (2003)** *AKT1* and *TRH1* are required during root hair elongation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 54: 781-788.
- Desbrosses G, Kopka C, Ott T and Udvardi MK. (2004)** *Lotus japonicus LjKUP* is induced late during nodule development and encodes a potassium transporter of the plasma membrane. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 789-797.
- Deverel SJ and Fujii R. (1990)** Chemistry of Trace Elements in Soils and Ground Water, pp 64-90. En: Agricultural Salinity Assessment and Management. Editor: Tanji KK. American Society of Civil Engineers
- Devoto A and Turner JG. (2003)** Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann. Bot. (Lond)*. 92: 329-337.
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD and Hama H. (2001)** Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 759-769.
- Diatloff E, Roberts M, Sanders D and Roberts SK. (2004)** Characterization of anion channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation. *Plant Physiol.* 136: 4136-4149.
- Dixon DP, Van Lith M, Edwards R and Benham A. (2003)** Cloning and initial characterization of the *Arabidopsis thaliana* endoplasmic reticulum oxidoreductins. *Antioxid. Redox Signal.* 5: 389-396.
- Dobrovinskaya OR, Muniz J and Pottosin II. (1999)** Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *J. Membr. Biol.* 167: 127-140.
- Doupnik CA, Davidson N and Lester HA. (1995)** The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 268-277.
- Downey P, Szabo I, Ivashikina N, Negro A, Guzzo F, Ache P, Hedrich R, Terzi M and Schiavo FL. (2000)** KDC1, a novel carrot root hair K⁺ channel. Cloning, characterization, and expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 275: 39420-39426.
- Dreyer I, Antunes S, Hoshi T, Muller-Rober B, Palme K, Pongs O, Reintanz B and Hedrich R. (1997)** Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophys. J.* 72: 2143-2150.
- Dreyer I, Becker D, Bregante M, Gambale F, Lehnen M, Palme K and Hedrich R. (1998)** Single mutations strongly alter the K⁺-selective pore of the K(in) channel KAT1. *FEBS Lett.* 430: 370-376.
- Dreyer I, Michard E, Lacombe B and Thibaud J-B. (2001)** A plant Shaker-like K⁺ channel switches between two distinct gating modes resulting in either inward-rectifying or "leak" current. *FEBS Lett.* 505: 233-39
- Duke SO. (2005)** Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. *Pest. Manag. Sci.* 61: 211-218.
- Dyson, T. (1999)** World food trends and prospects to 2025. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5929-5936.

- Ehrhardt T, Zimmermann S and Müller-Röber B. (1997)** Association of plant K⁺ in channels is mediated by conserved C termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Lett.* 409: 166-170
- Elumalai RP, Nagpal P and Reed JW. (2002)** A mutation in the *Arabidopsis* KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *Plant Cell.* 14: 119-131.
- Epstein E, Rains DW and Elzam OE. (1963)** Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 49: 684-692.
- Epstein E. (2003)** Foreword, pp xiii-xiv. En: Crop Production in Saline Environments. Editors: Goyal SS, Sharma SK and Rains W. Food Product Press
- Erez O and Kahana C. (2001)** Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 21:175-184.
- Espinosa-Ruiz A, Belles JM, Serrano R and Culianez-MacIa FA. (1999)** *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant J.* 20: 529-539.
- Essah PA, Davenport R and Tester M. (2003)** Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 307-318.
- Ezquer, I (2005)** Caracterización de un mutante de *Arabidopsis thaliana* resistente a cationes tóxicos. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia-ETSIA
- Fairley-Grenot K and Assmann SM. (1991)** Evidence for G-protein regulation of inward K⁺ channel current in guard cells of fava bean. *Plant Cell.* 3: 1037-1044.
- FAO (2006a)** Base de Datos TERRASTAT En: Land and Water Development Division. AGLL. FAO <http://www.fao.org/landandwater/agll/index.stm>
- FAO (2006b)** Oficina Regional de la FAO para América Latina y Caribe. <http://www.rlc.fao.org/paises/>
- Fassio A and Sitia R. (2002)** Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Histochem. Cell Biol.* 117: 151-157.
- Felle H. (1981)** A study of the current-voltage relationships of electrogenic active and passive membrane elements in *Riccia fluitans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 646: 151-160.
- Felle HH. (1994)** The H⁺/Cl⁻ symporter in root hair cells of *Sinapis alba*. *Plant Physiol.* 106: 1131-1136.
- Fermin G, Tennant P, Gonsalves C, Lee D, and Gonsalves D. (2005)** Comparative development and impact of transgenic papayas in Hawaii, Jamaica and Venezuela. *Methods Mol. Biol.* 286: 399-430.
- Fernández JA y Maldonado JM (2000)** Absorción y transporte de nutrientes minerales, pp 99-112. En: Fundamentos de fisiología Vegetal Editores: Azcón-Bieto J y Talón M. McGraw-Hill.
- Fernando M, Kulpa J, Siddiqi MY and Glass AD. (1990)** Potassium-Dependent Changes in the Expression of Membrane-Associated Proteins in Barley Roots : I. Correlations with K(Rb) Influx and Root K Concentration. *Plant Physiol.* 92: 1128-1132.
- Ferguson GP. (1999)** Protective mechanisms against toxic electrophiles in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* 7: 242-247.
- Finn JT, Grunwald ME and Yau KW. (1996)** Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 395-426
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Twyman RM. (2004)** Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7: 152-158.

- Flores HE and Galston AW. (1982)** Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol.* 69: 701-706.
- Florijn P J and van Beusichem M L. (1993)** Cadmium distribution in maize inbred lines. Effect of pH and level of cd supply. *Plant Soil.* 153: 79-84.
- Flowers TJ, Troke PF and Yeo AR. (1977)** The mechanisms of salt tolerance in halophytes, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28: 89-121.
- Flowers TJ and Dalmond D. (1992)** Protein synthesis in halophytes: The influence of potassium, sodium and magnesium in vitro. *Plant Soil* 146: 153-161.
- Flowers, T.J. (2003)** Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
- Forment J, Naranjo MA, Roldán M, Serrano R and Vicente O. (2002).** Expresión of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *Plant J.* 30: 511-519.
- Foyer CH and Noctor G. (2005)** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* 17: 1866-1875.
- Frاند AR and Kaiser CA. (1999)** Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell.* 4: 469-477.
- Frاند AR and Kaiser CA. (2000)** Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* 11: 2833-2843.
- Fricke W, Akhiyarova G, Wei W, Alexandersson E, Miller A, Kjellbom PO, Richardson A, Wojciechowski T, Schreiber L, Veselov D, Kudoyarova G and Volkov V. (2006)** The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *J Exp. Bot.* 57: 1079-1095.
- Frigerio M, Alabadi D, Perez-Gomez J, Garcia-Carcel L, Phillips AL, Hedden P and Blazquez MA. (2006)** Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142: 553-563.
- Fu HH and Luan S. (1998)** AtKUP1: a dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10: 63-73.
- Fuchs I, Stolze S, Ivashikina N and Hedrich R. (2005)** Rice K⁺ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress. *Planta.* 221: 212-221
- Fuchs I, Philippar K and Hedrich R. (2006)** Ion channels meet auxin action. *Plant Biol (Stuttg).* 8: 353-359.
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H and Tanaka Y. (2004)** Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* 45: 146-159.
- Gambale F and Uozumi N. (2006)** Properties of shaker-type potassium channels in higher plants. *J. Membr. Biol.* 210: 1-19.
- Gao D, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B and Plieth C. (2004)** Self-reporting *Arabidopsis* expressing pH and [Ca²⁺] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiol.* 134: 898-908.
- Garciadeblas B, Haro R and Benito B. (2007)** Cloning of two SOS1 transporters from the seagrass *Cymodocea nodosa*. SOS1 transporters from *Cymodocea* and *Arabidopsis* mediate potassium uptake in bacteria. *Plant Mol. Biol.* 63: 479-490
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV and Wu RJ. (2002)** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 15898-15903.

- Gari E, Piedrafita L, Aldea M and Herrero E. (1997)** A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 13: 837-848.
- Gatehouse AM, Ferry N and Raemaekers RJ. (2002)** The case of the monarch butterfly: a verdict is returned. *Trends Genet.* 18: 249-251.
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL and Fink GR. (2001)** Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 11444-11449.
- Gaymard F, Cerutti M, Horeau C, Lemaillet G, Urbach S, Ravallec M, Devauchelle G, Sentenac H and Thibaud J-B. (1996)** The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes. First characterization of the AKT1 K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 271: 22863-22870.
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud JB and Sentenac H. (1998)** Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*. 94: 647-655.
- Geisler M, Axelsen KB, Harper JF and Palmgren MG. (2000)** Molecular aspects of higher plant P-type Ca²⁺-ATPases. *Biochim Biophys Acta*. 1465: 52-78.
- Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P and Maurel C. (2002)** The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J*. 30: 71-81.
- Gierth M, Maser P and Schroeder JL. (2005)** The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol*. 137: 1105-1114.
- Gil-Mascarell R, Lopez-Coronado JM, Belles JM, Serrano R and Rodriguez PL. (1999)** The *Arabidopsis* HAL2-like gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase. *Plant J*. 17: 373-383.
- Gilliham M and Tester M. (2005)** The regulation of anion loading to the maize root xylem. *Plant Physiol*. 137: 819-828.
- Gobert A, Park G, Amtmann A, Sanders D and Maathuis FJ. (2006)** *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *J. Exp. Bot.* 57: 791-800.
- Golldack D, Su H, Quigley F, Kamasani UR, Munoz-Garay C, Balderas E, Popova OV, Bennett J, Bohnert HJ and Pantoja O. (2002)** Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *Plant J*. 31: 529-542.
- Golldack D, Quigley F, Michalowski CB, Kamasani UR and Bohnert HJ. (2003)** Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. *Plant Mol. Biol.* 51: 71-81.
- Gong Q, Li P, Ma S, Indu Rupassara S and Bohnert HJ. (2005)** Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 44: 826-839.
- González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R and Rodríguez PL. (2002)** The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin into abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14: 1833-1846.
- Gonzalez-Guzman M, Abia D, Salinas J, Serrano R and Rodriguez PL. (2004)** Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiol*. 135: 325-333.
- Goossens A, de La Fuente N, Forment J, Serrano R and Portillo F. (2000)** Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7654-7661.

- Gross E, Sevier CS, Vala A, Kaiser CA and Fass D. (2002)** A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nat. Struct. Biol.* 9: 61-67.
- Gross E, Kastner D, Kaiser C and Fass D. (2004)** Structure of Ero1p, Source of Disulfide Bonds for Oxidative Protein Folding in the Cell. *Cell* 117: 601-610
- Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL and Craik DJ. (2006)** Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem. Sci.* 31: 455-464.
- Gulbis JM, Mann S and MacKinnon R. (1999)** Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. *Cell* 97: 943-52.
- Guo ZJ, Chen XJ, Wu XL, Ling JQ and Xu P. (2004)** Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 55: 607-618.
- Hajdukiewicz P, Svab Z and Maliga P. (1994)** The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25: 989-994.
- Hahnenberger KM, Jia Z and Young PG. (1996)** Functional expression of the *Schizosaccharomyces pombe* Na⁺/H⁺ antiporter gene, *sod2*, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5031-5036.
- Halfter U, Ishitani M and Zhu JK. (2000)** The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 3735-3740.
- Hamana K. (1997)** Polyamine distribution patterns within the families *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae*, and *Halomonadaceae*, and related genera of the gamma subclass of the Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 49-59.
- Hamana K and Itoh T. (2001)** Polyamines of the hyperthermophilic archaeobacteria belonging to the genera *Thermococcus* and *Methanothermus* and two new genera *Caldivirga* and *Palaeococcus*. *Microbios.* 104: 105-114.
- Hamana K, Niitsu M, Samejima K and Itoh T. (2001)** Polyamines of the thermophilic eubacteria belonging to the genera *Thermosiphon*, *Thermaerobacter* and *Caldicellulosiruptor*. *Microbios.* 104: 177-185.
- Hamana K, Aizaki T, Arai E, Saito A, Uchikata K and Ohnishi H. (2004)** Distribution of norspermidine as a cellular polyamine within micro green algae including non-photosynthetic *achlorophyllous* *Polytoma*, *Polytomella*, *Prototheca* and *Helicosporidium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50: 289-295.
- Hartje S, Zimmermann S, Klonus D and Müller-Röber 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.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK and Bohnert HJ. (2000)** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Hashimoto Y, Suga Y, Matsuba S, Mizoguchi M, Takamori K, Seitz J and Ogawa H. (2001)** Inquiry into the role of skin sulfhydryl oxidase in epidermal disulfide bond formation: implications of the localization and regulation of skin SOx as revealed by TPA, retinoic acid, and UVB radiation. *J. Invest. Dermatol.* 117: 752-754.
- He C, Yan J, Shen G, Fu L, Holaday AS, Auld D, Blumwald E and Zhang H. (2005)** Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* 46: 1848-1854.
- Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch TJ and Steinmeyer K. (1996)** A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J. Biol. Chem.* 271: 33632-33638.
- Hernández JA, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA and Sevilla F. (1993)** Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol Plant* 89: 103-110

- Hernández JA and Almansa MS. (2002)** Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiol Plant.* 5: 251-257.
- Hertel B, Horvath F, Wodala B, Hurst A, Moroni A and Thiel G. (2005)** KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium. *J. Exp. Bot.* 56: 3103-3110.
- Hill JE, Myers AM, Koerner TJ and Tzagoloff A. (1986)** Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast.* 2: 163-167.
- Hiniker A and Bardwell JC. (2004)** Disulfide relays between and within proteins: the Ero1p structure. *Trends Biochem. Sci.* 29: 516-519.
- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP and Sussman MR. (1998)** A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280: 918-21
- Hirschi KD. (2004)** The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiol.* 136: 2438-2442.
- Holdaway-Clarke TL, Walker NA, Hepler PK and Overall RL. (2000)** Physiological elevations in cytoplasmic free calcium by cold or ion injection result in transient closure of higher plant plasmodesmata. *Planta.* 210: 329-335.
- Holmes DS and Quigley M. (1981)** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- Hooper KL, Glynn NM, Burnside J, Coppock DL and Thorpe C. (1999a)** Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. *J. Biol. Chem.* 274: 31759-31762.
- Hooper KL, Sheasley SL, Gilbert HF and Thorpe C. (1999b)** Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides. *J. Biol. Chem.* 274: 22147-22150.
- Hooper KL and Thorpe C. (1999)** Egg white sulfhydryl oxidase: kinetic mechanism of the catalysis of disulfide bond formation. *Biochemistry.* 38: 3211-3217.
- Hooper KL and Thorpe C. (2002)** Flavin-dependent sulfhydryl oxidases in protein disulfide bond formation. *Methods Enzymol.* 348: 30-34.
- Horie T and Schroeder JI. (2004)** Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol.* 136: 2457-2462.
- Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, Leung HY, Miyao A, Hirochika H, An G, Schroeder JI. (2007)** Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO J.* 26: 3003-3014.
- Hoshi T. (1995)** Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors. *J. Gen. Physiol.* 105: 309-328
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA, Simonneau T, Thibaud JB and Sentenac H. (2003)** The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 5549-5554.
- Hoth S, Dreyer I, Dietrich P, Becker D, Müller-Röber B and Hedrich R. (1997)** Molecular basis of plant-specific acid activation of K⁺ uptake channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 4806-4810
- Hoth S, Geiger D, Becker D and Hedrich R. (2001)** The pore of plant K⁺ channels is involved in voltage and pH sensing: domain-swapping between different K⁺ channel alpha-subunits. *Plant Cell* 13: 943-952

- Hothorn M, Wachter A, Gromes R, Stuwe T, Rausch T and Scheffzek K. (2006)** Structural basis for the redox control of plant glutamate cysteine ligase. *J. Biol. Chem.* 281: 27557-27565.
- Houston NL, Fan C, Xiang JQ, Schulze JM, Jung R and Boston RS. (2005)** Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant Physiol.* 137: 762-778.
- Howard AR and Donovan LA (2007)** Helianthus Nighttime Conductance and Transpiration Respond to Soil Water But Not Nutrient Availability *Plant Physiol.* 143: 145-155.
- Hua BG, Mercier RW, Leng Q and Berkowitz GA. (2003)** Plants do it differently. A new basis for potassium/sodium selectivity in the pore of an ion channel. *Plant Physiol.* 132: 1353-1361.
- Huang S, Cerny RE, Bhat DS and Brown SM. (2001)** Cloning of an *Arabidopsis* patatin-like gene, STURDY, by activation T-DNA tagging. *Plant Physiol.* 125: 573-584.
- Hwang I, Chen HC and Sheen J. (2002)** Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 500-515.
- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T and Shinozaki K. (2000)** Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* 24: 655-665.
- Imai Y, Ishikawa E, Asada S and Sugimoto Y. (2005)** Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer Res.* 65: 596-604.
- Inan G, Zhang Q, Li P, Wang Z, Cao Z, Zhang H, Zhang C, Quist TM, Goodwin SM, Zhu J, Shi H, Damsz B, Charbaji T, Gong Q, Ma S, Fredricksen M, Galbraith DW, Jenks MA, Rhodes D, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Joly RJ, Bressan RA and Zhu JK. (2004)** Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiol.* 135: 1718-1737.
- Inoue A, Yoshida N, Omoto Y, Oguchi S, Yamori T, Kiyama R and Hayashi S. (2002)** Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J. Mol. Endocrinol.* 29: 175-192.
- ISAAA. (2006)** Situación global de los cultivos transgénicos/GM comercializados: 2006. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). <http://www.isaaa.org/>
- Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim CS, Shi W and Zhu JK. (2000)** SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell.* 12: 1667-1678.
- Ito T and Meyerowitz EM. (2000)** Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, CYP78A9, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 12: 1541-1550.
- Ivashikina N, Becker D, Ache P, Meyerhoff O, Felle HH and Hedrich R. (2001)** K⁺ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Letters* 508: 463-469.
- Ivashikina N, Deeken R, Fischer S, Ache P and Hedrich R. (2005)** AKT2/3 subunits render guard cell K⁺ channels Ca²⁺ sensitive. *J. Gen. Physiol.* 125: 483-492.
- Jacobson T and Adams RM. (1958)** Salt and silt in ancient mesopotamian agriculture. *Science.* 128: 1251-1258
- James C. (2004)** Global Status of GM Crops, their Contribution to Sustainability and Future Prospects. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). <http://www.isaaa.org>
<http://www.europabio.org/documents/200404/presentation.pdf>
- Jan LY and Jan YN. (1997)** Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 91-123
- Janolino VG and Swaisgood HE. (1975)** Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase from bovine milk. *J. Biol. Chem.* 250: 2532-2538.

- Janolino VG and Swaisgood HE. (1987)** Sulfhydryl oxidase-catalyzed formation of disulfide bonds in reduced ribonuclease. *Arch. Biochem. Biophys.* 258: 265-271.
- Johansson I, Wulfetange K, Poree F, Michard E, Gajdanowicz P, Lacombe B, Sentenac H, Thibaud JB, Mueller-Roeber B, Blatt MR and Dreyer I. (2006)** External K⁺ modulates the activity of the *Arabidopsis* potassium channel SKOR via an unusual mechanism. *Plant J.* 46: 269-281.
- Kadokura H, Katzen F and Beckwith J. (2003)** Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 111-135.
- Kakinuma Y, Maruyama T, Nozaki T, Wada Y, Ohsumi Y and Igarashi K. (1995)** Cloning of the gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 216: 985-992.
- Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Masumura T and Tanaka K. (1999)** Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radic. Res.* 31 Suppl: S219-225.
- Kaouass M, Audette M, Ramotar D, Verma S, De Montigny D, Gamache I, Torossian K and Poulin R. (1997)** The STK2 gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 17: 2994-3004.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. (1999)** Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol.* 17: 287-291.
- Kelly WB, Esser JE and Schroeder JI. (1995)** Effects of cytosolic calcium and limited, possible dual, effects of G protein modulators on guard cell inward potassium channels. *Plant J.* 8: 479-489.
- Kennedy BF and De Fillippis LF. (1999)** Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *J. Plant Physiol.* 155: 746-754.
- Kiegle E, Gilliam M, Haseloff J and Tester M. (2000)** Hyperpolarisation-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Journal* 21: 225-229.
- Kim EJ, Kwak JM, Uozumi N and Schroeder JI. (1998)** *AtKUP1*: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10: 51-62.
- Kinraide TB (1998)** Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities. *Plant Physiol* 118: 513-520.
- Kitashiba H, Ishizaka T, Isuzugawa K, Nishimura K and Suzuki T. (2004)** Expression of a sweet cherry DREB1/CBF ortholog in *Arabidopsis* confers salt and freezing tolerance. *J. Plant Physiol.* 161: 1171-1176.
- Klobus G and Janicka-Russak M. (2004)** Modulation by cytosolic components of proton pump activities in plasma membrane and tonoplast from *Cucumis sativus* roots during salt stress. *Physiol Plant.* 121: 84-92.
- Knight H, Trewas AJ and Knight MR. (1997)** Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12: 1067-1078.
- Knight H. (2000)** Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* 195: 269-324.
- Koch M, Vorwerk S, Masur C, Sharifi-Sirchi G, Olivieri N, Schlaich NL. (2006)** A role for a flavin-containing mono-oxygenase in resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant J.* 47: 629-639.
- Köhler C, Merkle T and Neuhaus G. (1999)** Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18:97-104.
- Köhler C and Neuhaus G. (2000)** Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 471: 133-136.

- Köhler B and Raschke K. (2000)** The delivery of salts to the xylem: three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. *Plant Physiol.* 122: 243-254.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G and Sheen J. (2000)** Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2940-2945.
- Krishnamurthy R and Bhagwat KA. (1989)** Polyamines as Modulators of Salt Tolerance in Rice Cultivars. *Plant Physiol.* 91: 500-504.
- Kruger NJ. (1994)** The Bradford method for protein quantitation. *Methods. Mol. Biol.* 32: 9-15.
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W and Luan S. (1999)** Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 4718-23.
- Kuiper D, Schuit J and Kuiper PJC. (1990)** Actual cytokinin concentrations in plant tissue as an indicator for salt resistance in cereals. *Plant Soil.* 123: 243-250.
- Kyte J and Doolittle RF. (1982)** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Lacan D and Durand M. (1996)** Na⁺-K⁺ Exchange at the Xylem/Symplast Boundary (Its Significance in the Salt Sensitivity of Soybean). *Plant Physiol.* 110: 705-711.
- Lacombe B, Pilot G, Gaymard F, Sentenac H and Thibaud J-B. (2000a)** pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. *FEBS Lett.* 466: 351-354.
- Lacombe B, Pilot G, Michard E, Gaymard F, Sentenac H and Thibaud JB. (2000b)** 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 UK. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lagarde D, Basset M, Lepetit M, Conejero G, Gaymard F, Astruc S and Grignon C. (1996)** Tissue-specific expression of *Arabidopsis* AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant J.* 9: 195-203.
- Laloi C, Apel K and Danon A. (2004)** Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 323-328.
- LaMantia ML and Lennarz WJ. (1993)** The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell.* 74: 899-908.
- Langer K, Ache P, Geiger D, Stinzinger A, Arend M, Wind C, Regan S, Fromm J and Hedrich R. (2002)** Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. *Plant J.* 32: 997-1009.
- Lash LH and Jones DP. (1983)** Characterization of the membrane-associated thiol oxidase activity of rat small-intestinal epithelium. *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 344-352.
- Latorre R, Olcese R, Basso C, Gonzalez C, Munoz F, Cosmelli D and Alvarez O. (2003)** Molecular coupling between voltage sensor and pore opening in the *Arabidopsis* inward rectifier K⁺ channel KAT1. *J. Gen. Physiol.* 122: 459-469.
- Laurie S, Feeney KA, Maathuis FJ, Heard PJ, Brown SJ and Leigh RA. (2002)** A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* 32: 139-49.
- Lee J, Hofhaus G and Lisowsky T. (2000)** Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett.* 477: 62-66.

- Legočka J and Kluk A. (2005)** Effect of salt and osmotic stress on changes in polyamine content and arginine decarboxylase activity in *Lupinus luteus* seedlings. *J Plant Physiol.* 162: 662-668.
- Leng Q, Mercier RW, Hua BG, Fromm H and Berkowitz GA. (2002)** Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol.* 128: 400-410.
- Lertpiriyapong K and Sung ZR. (2003)** The elongation defective1 mutant of *Arabidopsis* is impaired in the gene encoding a serine-rich secreted protein. *Plant Mol. Biol.* 53: 581-595.
- Levitan A, Danon A and Lisowsky T. (2004)** Unique features of plant mitochondrial sulfhydryl oxidase. *J. Biol. Chem.* 279: 20002-20008.
- Li W and Assmann SM. (1993)** Characterization of a G-protein-regulated outward K⁺ current in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 262-266.
- Li W, Luan S, Schreiber SL and Assmann SM. (1994a).** Cyclic AMP stimulates K⁺ channel activity in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 106: 957-961.
- Li W, Luan S, Schreiber SL and Assmann SM. (1994b)** Evidence for protein phosphatase 1 and 2A regulation of K⁺ channels in two types of leaf cells. *Plant Physiol.* 106: 963-970.
- Li J, Lee YR and Assmann SM. (1998)** Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol.* 116: 785-795.
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE and Walker JC. (2002)** BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell.* 110: 213-222.
- Li X-L, Borsics T, Harrington HM and Christopher DA (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*. *Funct. Plant Biol.* 32: 643-653
- Li L, Kim BG, Cheong YH, Pandey GK and Luan S. (2006)** A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 12625-12630.
- Lippuner V, Cyert MS and Gasser CS. (1996)** Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast. *J. Biol. Chem.* 271: 12859-12866.
- Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, Francavilla A and Hofhaus G. (2001)** Mammalian augments of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig. Liver. Dis.* 33: 173-180.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. (1998)** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10: 1391-1406.
- Liu J and Zhu JK. (1998)** A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280: 1943-1945.
- Liu K, Fu H, Bei Q and Luan S. (2000)** Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol.* 124: 1315-1326.
- Liu K, Li L and Luan S. (2005)** An essential function of phosphatidylinositol phosphates in activation of plant shaker-type K⁺ channels. *Plant J.* 42: 433-443.
- Liu K, Li L and Luan S. (2006)** Intracellular K⁺ sensing of SKOR, a Shaker-type K⁺ channel from *Arabidopsis*. *Plant J.* 46: 260-268.
- Lorenzen I, Aberle T and Plieth C. (2004)** Salt stress-induced chloride flux: a study using transgenic *Arabidopsis* expressing a fluorescent anion probe. *Plant J.* 38: 539-544.

- Luan S, Li W, Rusnak F, Assmann SM and Schreiber SL. (1993)** Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2202-2206.
- Ludwig AA, Romeis T and Jones JD. (2004)** CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J. Exp. Bot.* 55: 181-188.
- Luo GZ, Wang HW, Huang J, Tian AG, Wang YJ, Zhang JS and Chen SY. (2005)** A putative plasma membrane cation/proton antiporter from soybean confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 59: 809-820.
- Ma X, Qian Q and Zhu D. (2005)** Expression of a calcineurin gene improves salt stress tolerance in transgenic rice. *Plant Mol. Biol.* 58: 483-495.
- Maas EV. (1993)** Salinity and citriculture. *Tree Physiol.* 12: 195-216.
- Maathuis FJ and Sanders D. (1993)** Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 191: 302-307
- Maathuis FJ and Sanders D. (1994)** Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9272-9276.
- Maathuis FJ and Sanders D. (1995)** Contrasting roles in ion transport of two K⁺-channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 197: 456-464.
- Maathuis FJ and Sanders D. (1999)** Plasma membrane transport in context-making sense out of complexity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 236-243.
- Maathuis FJ, Filatov V, Herzyk P, Krijger GC, Axelsen KB, Chen S, Green BJ, Li Y, Madagan KL, Sanchez-Fernandez R, Forde BG, Palmgren MG, Rea PA, Williams LE, Sanders D and Amtmann A. (2003)** Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant J.* 35: 675-692.
- Maathuis FJ. (2006)** The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *J. Exp. Bot.* 57: 1137-1147.
- Mahajan S and Tuteja N. (2005)** Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139-158.
- Maiale S, Sanchez DH, Guirado A, Vidal A and Ruiz OA. (2004)** Spermine accumulation under salt stress. *J Plant Physiol.* 161: 35-42.
- Mairet-Coello G, Tury A, Esnard-Fève A, Fellmann D, Risold PY and Griffond B (2004)** FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. *J. Comp. Neurol* 473: 334-363.
- Malkin R and Niyogi K. (2000)** Photosynthesis, pp 568-628. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Editors: Buchanan BB, Gruissem W and Jones RL. American Society of Plant Physiologists.
- Marin K, Suzuki I, Yamaguchi K, Ribbeck K, Yamamoto H, Kanesaki Y, Hagemann M and Murata N. (2003)** Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 9061-9066.
- Marschner H. (1995)** Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press.
- Marten I, Hoth S, Deeken R, Ache P, Ketchum KA, Hoshi T and Hedrich R. (1999)** AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7581-7586.
- Martínez JC. (2001)** Evolución de la población mundial. En: *La economía de mercado: Virtudes e inconvenientes*. Enciclopedia y Biblioteca EUMEDNET <http://www.eumed.net/cursecon/2/evolucion.htm>

- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA and Guerinot ML. (2001)** Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 1646-1667.
- Maser P, Hosoo Y, Goshima S, Horie T, Eckelman B, Yamada K, Yoshida K, Bakker EP, Shinmyo A, Oiki S, Schroeder JI and Uozumi N. (2002)** Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 6428-6433.
- Massey V. (1994)** Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269: 22459-22462.
- Matsuba S, Suga Y, Ishidoh K, Hashimoto Y, Takamori K, Kominami E, Wilhelm B, Seitz J and Ogawa H. (2002)** Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. *J. Dermatol. Sci.* 30: 50-62.
- Matsumoto TK, Pardo JM, Takeda S, Bressan RA and Hasegawa PM. (2001)** Tobacco and *Arabidopsis* SLT1 mediate salt tolerance of yeast. *Plant Mol. Biol.* 45: 489-500.
- McCormack E, Tsai YC and Braam J. (2005)** Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci.* 10: 383-389.
- McDonald EP, Erickson JE and Kruger EL (2002)** Can decreased transpiration limit plant nitrogen acquisition in elevated CO₂? *Funct. Plant Biol.* 29: 1115-1120
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM and Meagher RB. (1995)** Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants *act2-1* and *act4-1*. *Plant J.* 8: 613-622.
- Meinke D and M Koornneef (1997)** Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant J.* 12: 247-253
- Menezes-Benavente L, Kernodle SP, Margis-Pinheiro M, Scandalios JG. (2004)** Salt-induced antioxidant metabolism defenses in maize (*Zea mays L.*) seedlings. *Redox Rep.* 9: 29-36.
- Messens J and Collet JF. (2006)** Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 1050-1062.
- Meyerowitz EM. (1989)** *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell.* 56: 263-269.
- Michard E, Dreyer I, Lacombe B, Sentenac H and Thibaud JB. (2005a)** Inward rectification of the AKT2 channel abolished by voltage-dependent phosphorylation. *Plant J.* 44: 783-797.
- Michard E, Lacombe B, Poree F, Mueller-Roeber B, Sentenac H, Thibaud JB and Dreyer I. (2005b)** A unique voltage sensor sensitizes the potassium channel AKT2 to phosphoregulation. *J. Gen. Physiol.* 126: 605-617.
- Michel K, Abderhalden O, Bruggmann R and Dudler R. (2006)** Transcriptional changes in powdery mildew infected wheat and *Arabidopsis* leaves undergoing syringolin-triggered hypersensitive cell death at infection sites. *Plant Mol. Biol.* 62: 561-578.
- Mirza JI and Iqbal M. (1997)** Spermine-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with developmental abnormalities. *Plant Growth Regul.* 22: 151-156
- Mitsuya S, Takeoka Y and Miyake H. (2000)** Effects of sodium chloride on foliar ultrastructure of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) plantlets grown under light and dark conditions *in vitro*. *J. Plant Physiol.* 157: 661-667.
- Mittova V, Guy M, Tal M and Volokita M. (2002)** Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Radic. Res.* 36: 195-202.

- Moore EE, Kuestner RE, Conklin DC, Whitmore TE, Downey W, Buddle MM, Adams RL, Bell LA, Thompson DL, Wolf A, Chen L, Stamm MR, Grant FJ, Lok S, Ren H and De Jongh KS (1999)** Stanniocalcin 2: characterization of the protein and its localization to human pancreatic alpha cells. *Horm. Metab. Res.* 31: 406-414.
- Moran N. (1996)** Membrane-delimited phosphorylation enables the activation of the outward-rectifying K channels in motor cell protoplasts of *Samanea saman*. *Plant Physiol.* 111: 1281-1292.
- Moshelion M, Becker D, Czempinski K, Müller-Röber B, Attali B, Hedrich R and Moran N. (2002)** Diurnal and circadian regulation of putative potassium channels in a leaf moving organ. *Plant Physiol.* 128: 634-642.
- Mouline K, Very AA, Gaymard F, Boucherez J, Pilot G, Devic M, Bouchez D, Thibaud JB, Sentenac H. (2002)** Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 16: 339-350.
- Muir SR and Sanders D. (1997)** Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiol.* 114: 1511-1521.
- Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR and Serrano R. (1999)** A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell Biol.* 19: 3328-3337.
- Munns R. (2002)** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns R. (2005)** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167: 645-663.
- Musard JF, Sallot M, Dulieu P, Fraichard A, Ordener C, Remy-Martin JP, Jouvenot M and Adami P. (2001)** Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287: 83-91.
- Naciones Unidas. (2005)** World Population Prospects. The 2004 Revision. UN. New York
- Nakagami H, Pitzschke A and Hirt H. (2005)** Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci.* 10: 339-346.
- Nakamura RL, McKendree WL Jr, Hirsch RE, Sedbrook JC, Gaber RF and Sussman MR. (1995)** Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiol.* 109: 371-374
- Naranjo MA, Romero C, Belles JM, Montesinos C, Vicente O and Serrano R. (2003)** Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. *Planta.* 217: 417-424.
- Nelson DE, Koukoumanos M and Bohnert HJ. (1999)** Myo-inositol-dependent sodium uptake in ice plant. *Plant Physiol.* 119: 165-172.
- Niños R. (2005)** Aislamiento y caracterización de un mutante de *Arabidopsis thaliana* específicamente resistente a litio. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia-ETSIA
- Niu X, Narasimhan ML, Salzman RA, Bressan RA and Hasegawa PM. (1993)** NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol.* 103: 713-718.
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM and Pardo JM. (1995)** Ion homeostasis in NaCl stress environment. *Plant Physiol.* 109: 735-742.
- Noctor G and Foyer CH. (1998)** Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- Nublat A, Desplans J, Casse F and Berthomieu P. (2001)** *sas1*, an *Arabidopsis* mutant overaccumulating sodium in the shoot, shows deficiency in the control of the root radial transport of sodium. *Plant Cell.* 13: 125-137.

- Obrdlik P, El-Bakkoury M, Hamacher T, Cappellaro C, Vilarino C, Fleischer C, Ellerbrok H, Kamuzinzi R, Ledent V, Blaudez D, Sanders D, Revuelta JL, Boles E, Andre B and Frommer WB. (2004)** K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 12242-12247.
- Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH and Granell A. (2006)** Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol.* 140: 3-11.
- Ostrowski MC and Kistler WS (1980)** Properties of a flavoprotein sulphhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry* 19: 2639-2645
- Pagani M, Fabbri M, Benedetti C, Fassio A, Pilati S, Bulleid NJ, Cabibbo A and Sitia R. (2000)** Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-beta (ERO1-Lbeta), a human gene induced in the course of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 275: 23685-23692.
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL and Drake R. (2005)** Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat. Biotechnol.* 23: 482-487.
- Pardo JM, Reddy MP, Yang S, Maggio A, Huh GH, Matsumoto T, Coca MA, Paino-D'Urzo M, Koiwa H, Yun DJ, Watad AA, Bressan RA and Hasegawa PM. (1998)** Stress signaling through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 9681-9686.
- Parida AK, Das AB and Mitra B. (2004)** Effects of salt on growth, ion accumulation photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees-Struct. Funct.* 18: 167-174.
- Parida AK and Das AB. (2005)** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 324-349.
- Parker RE. (1981)** Estadística para Biólogos. Omega SA.
- Patel AJ and Honoré E. (2001)** Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci.* 24: 339-346
- Pei ZM, Ward JM, Harper JF and Schroeder JI. (1996)** A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *EMBO J.* 15: 6564-6574.
- Philippar K, Ivashikina N, Ache P, Christian M, Luthen H, Palme K and Hedrich R. (2004)** Auxin activates KAT1 and KAT2, two K⁺-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 37: 815-827.
- Piao HL, Lim JH, Kim SJ, Cheong GW and Hwang I. (2001)** Constitutive over-expression of *AtGSK1* induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27: 305-314.
- Pilot G, Lacombe B, Gaymard F, Cherel I, Boucherez J, Thibaud JB and Sentenac H. (2001)** Guard cell inward K⁺ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *J. Biol. Chem.* 276: 3215-3221.
- Pilot G, Gaymard F, Mouline K, Cherel I, Sentenac H. (2003)** Regulated expression of *Arabidopsis* shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant. Mol. Biol.* 51: 773-787.
- Piñeros MA and Kochian LV. (2003)** Differences in whole-cell and single-channel ion currents across the plasma membrane of mesophyll cells from two closely related *Thlaspi* species. *Plant Physiol.* 131: 583-594.
- Pittman JK and Hirschi KD. (2003)** Don't shoot the (second) messenger: endomembrane transporters and binding proteins modulate cytosolic Ca²⁺ levels. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 257-262.

- Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin HX, Luan S, Maser P, Pantoja O, Rodriguez-Navarro A, Schachtman DP, Schroeder JI, Sentenac H, Uozumi N, Very AA, Zhu JK, Dennis ES and Tester M. (2006)** Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* 11: 372-374.
- Pratelli R, Lacombe B, Torregrosa L, Gaymard F, Romieu C, Thibaud JB and Sentenac H. (2002)** A grapevine gene encoding a guard cell K⁺ channel displays developmental regulation in the grapevine berry. *Plant Physiol.* 128: 564-577.
- Pratt PF and Suarez DL. (1990)** Irrigation Water Quality Assessments, pp 220-236. En: Agricultural Salinity Assessment and Management. Editor: Tanji KK. American Society of Civil Engineers.
- Price J, Laxmi A, St Martin SK and Jang JC. (2004)** Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16: 2128-2150.
- Prins M. (2003)** Broad virus resistance in transgenic plants. *Trends Biotechnol.* 21: 373-375.
- Qi Z and Spalding EP. (2004)** Protection of plasma membrane K⁺ transport by the salt overly sensitive1 Na⁺-H⁺ antiporter during salinity stress. *Plant Physiol.* 136: 2548-2555.
- Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS and Zhu JK. (2002)** Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 8436-8441.
- Qiu QS, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Zhu JK and Schumaker KS. (2003)** Na⁺/H⁺ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 1041-1052.
- Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS and Zhu JK. (2004)** Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J Biol. Chem.* 279: 207-215.
- Quesada V, Ponce MR and Micol JL. (2000)** Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* 154: 421-436.
- Quintero FJ, Garcíadeblás B and Rodríguez-Navarro A. (1996)** The *SAL1* gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3' (2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *Plant Cell* 8: 529-537.
- Quintero FJ and Blatt MR. (1997)** A new family of K⁺ transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS Lett.* 415: 206-211.
- Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu JK and Pardo JM. (2002)** Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 9061-9066.
- Radom J, Colin D, Thiebault F, Dognin-Bergeret M, Mairet-Coello G, Esnard-Fève A, Fellmann D and Jouvenot M. (2006)** Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1759: 225-233.
- Raje S and Thorpe C. (2003)** Inter-domain redox communication in flavoenzymes of the quiescin/sulfhydryl oxidase family: role of a thioredoxin domain in disulfide bond formation. *Biochemistry.* 42: 4560-4568.
- Rathinasabapathi B, Sigua CA, HJ and Gage DA. (2000)** Osmoprotectant β-alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae: S-adenosyl-L-methionine dependent N-methylation of β-alanine to its betaine is via N-methyl and N, N-dimethyl β-alanines. *Physiol. Plant.* 109: 225-231
- Rausell A, Kanhonou R, Yenush L, Serrano R and Ros R. (2003)** The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *Plant J.* 34: 257-267.
- Reddy AS. (2001)** Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci.* 160: 381-404.

- Reintanz B, Szyroki A, Ivashikina N, Ache P, Godde M, Becker D, Palme K and Hedrich R. (2002)** AtKCl1, a silent *Arabidopsis* potassium channel α -subunit modulates root hair K^+ influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4079-4084.
- Rhee SG. (1999)** Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 31: 53-59.
- Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS and Siedow JN. (1998)** Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* 273: 30750-30756.
- Rigas S, Debrosses G, Haralampidis K, Vicente-Agullo F, Feldmann KA, Grabov A, Dolan L and Hatzopoulos P. (2001)** TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell.* 13: 139-151.
- Roberts SK. (1998)** Regulation of K^+ channels in maize roots by water stress and abscisic acid. *Plant Physiol.* 116: 145-153.
- Roberts SK and Snowman BN. (2000)** The effects of ABA on channel-mediated K^+ transport across higher plant roots. *J. Exp. Bot.* 51: 1585-1594.
- Roberts SK. (2006)** Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytol.* 169: 647-666.
- Rock CD. (2000)** Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* 148: 357-396.
- Rodríguez-Navarro A. (2000)** Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469: 1-30
- Rodríguez-Navarro A and Rubio F. (2006)** High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 1149-1160.
- Rojo E, Titarenko E, Leon J, Berger S, Vancanneyt G and Sanchez-Serrano JJ. (1998)** Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 13: 153-165.
- Rosado A, Amaya I, Valpuesta V, Cuartero J, Botella MA and Borsani O. (2006)** ABA- and ethylene-mediated responses in osmotically stressed tomato are regulated by the TSS2 and TOS1 loci. *J. Exp. Bot.* 57: 3327-3335.
- Roth RA and Koshland ME. (1981)** Identification of a lymphocyte enzyme that catalyzes pentamer immunoglobulin M assembly. *J. Biol. Chem.* 256: 4633-4639
- Roxas VP, Smith RK Jr, Allen ER and Allen RD. (1997)** Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* 15: 988-991.
- Roxas VP, Lodhi SA, Garrett DK, Mahan JR and Allen RD. (2000)** Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41: 1229-1234.
- Ruggiero B, Koiwa H, Manabe Y, Quist TM, Inan G, Saccardo F, Joly RJ, Hasegawa PM, Bressan RA and Maggio A. (2004)** Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136: 3134-3147.
- Rus A Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA and Hasegawa PM. (2001)** AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na^+ entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 14150-14155.
- Rus A, Lee BH, Munoz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA and Hasegawa PM. (2004)** AtHKT1 facilitates Na^+ homeostasis and K^+ nutrition in planta. *Plant Physiol.* 136: 2500-2511.

- Saier MH Jr. (2000)** A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 64: 354-411.
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K and Izui K. (2000)** Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23: 319-327.
- Sambrook J and Russell D. (2000)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders D, Brownlee C and Harper JF. (1999)** Communicating with calcium. *Plant Cell.* 11: 691-706.
- Sanderson J (1983)** Water uptake by different regions of barley roots. Pathway of radial flow in relation to development of the endodermis. *J. Exp. Bot.* 34: 240-253
- Santa-Maria GE, Rubio F, Dubcovsky J and Rodriguez-Navarro A. (1997)** The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* 9: 2281-2289.
- Schachtman DP, Kumar R, Schroeder JI and Marsh EL (1997)** Molecular and functional characterisation of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 11079-11084.
- Schleyer M and Bakker EP. (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. *J. Bacteriol.* 175: 6925-6931
- Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JA and Amasino RM. (2003)** Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell.* 15: 151-163.
- Schonknecht G, Spoomaker P, Steinmeyer R, Bruggeman L, Ache P, Dutta R, Reintanz B, Godde M, Hedrich R and Palme K. (2002)** KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. *FEBS Letters* 511: 28-32
- Schroeder JI. (1995)** Anion channels as central mechanisms for signal transduction in guard-cells and putative functions in roots for plant-soil interactions. *Plant Mol. Biol.* 28: 353-361.
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM and Waner D. (2001)** Guard Cell Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 627-658.
- Schumaker KS and Sze H. (1987)** Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *J. Biol. Chem.* 262: 3944-3946.
- Schwarz M and Gale J. (1981)** Maintenance respiration and carbon balance of plants at low levels of sodium chloride salinity. *J. Exp. Bot.* 32: 933-941
- Senkevich TG, White CL, Weisberg A, Granek JA, Wolffe EJ, Koonin EV and Moss B. (2002)** Expression of the vaccinia virus A2.5L redox protein is required for virion morphogenesis. *Virology.* 300: 296-303.
- Senn ME, Rubio F, Banuelos MA and Rodriguez-Navarro A. (2001)** Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. *J. Biol. Chem.* 276: 44563-44569.
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F and Grignon C. (1992)** Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science.* 256: 663-665.
- Serrano R. (1978)** Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biochem.* 22: 51-63.
- Serrano R and Rodriguez-Navarro A. (2001)** Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 399-404
- Sevier CS, Cuzzo JW, Vala A, Aslund F and Kaiser CA. (2001)** A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat. Cell Biol.* 3: 874-882.

- Shabala S. (2003)** Regulation of potassium transport in leaves: from molecular to tissue level. *Ann. Bot. (Lond)*. 92: 627-634.
- Shabala L, Cuin TA, Newman IA and Shabala S. (2005)** Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis* sos mutants. *Planta*. 222: 1041-1050.
- Shabala S, Demidchik V, Shabala L, Cuin TA, Smith SJ, Miller AJ, Davies JM and Newman IA. (2006)** Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl-induced K^+ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K^+ -permeable channels. *Plant Physiol*. 141: 1653-1665.
- Sharp RE, Hsiao TC and Silk WK. (1990)** Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials; II. Role of Growth and Deposition of Hexose and Potassium in Osmotic Adjustment. *Plant Physiol*. 93: 1337-1346.
- Sharp RE and LeNoble ME. (2002)** ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp. Bot*. 53: 33-37.
- Sheen J. (1998)** Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 975-980.
- Shi H, Ishitani M, Kim C and Zhu JK. (2000)** The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 6896-6901.
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM and Zhu JK. (2002)** The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter *SOS1* controls long-distance Na^+ transport in plants. *Plant Cell*. 14: 465-477.
- Shi H, Lee BH, Wu SJ and Zhu JK. (2003)** Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol*. 21: 81-85.
- Shin R and Schachtman DP. (2004)** Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8827-8832.
- Siedow JN and Umbach AL. (1995)** Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology *Plant Cell* 7: 821-831
- Silveira JA, Viegas Rde A, da Rocha IM, Moreira AC, Moreira Rde A and Oliveira JT. (2003)** Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *J. Plant Physiol*. 160: 115-123.
- Skerrett M and Tyerman SD. (1994)** A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. *Planta* 192: 295-305.
- Skopelitis DS, Paranychanakis NV, Paschalidis KA, Pliakonis ED, Delis ID, Yakoumakis DI, Kouvarakis A, Papadakis AK, Stephanou EG, Roubelakis-Angelakis KA. (2006)** Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell*. 18: 2767-2781.
- Song CP, Guo Y, Qiu Q, Lambert G, Galbraith DW, Jagendorf A and Zhu JK. (2004)** A probable $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 10211-10216.
- Spalding EP and Goldsmith M. (1993)** Activation of K^+ channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* by ATP produced photosynthetically. *Plant Cell* 5: 477-484.
- Spalding EP, Hirsch RE, Lewis DR, Qi Z, Sussman MR and Lewis BD. (1999)** Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *J. Gen. Physiol*. 113: 909-918.
- Staehelin LA and Newcomb EH (2000)** Membrane Structure and Membranous Organelles, pp 2-50. En: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Editors: Buchanan BB, Gruissem W and Jones RL. American Society of Plant Physiologists.

- Su YH, North H, Grignon C, Thibaud JB, Sentenac H and Very AA. (2005)** Regulation by external K^+ in a maize inward shaker channel targets transport activity in the high concentration range. *Plant Cell*. 17: 1532-1548.
- Sun J, Niu QW, Tarkowski P, Zheng B, Tarkowska D, Sandberg G, Chua NH and Zuo J. (2003)** The *Arabidopsis* AtIPT8/PGA22 gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis. *Plant Physiol*. 131: 167-176.
- Sunarpi, Horie T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, Horie R, Chan WY, Leung HY, Hattori K, Konomi M, Osumi M, Yamagami M, Schroeder JI and Uozumi N. (2005)** Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na^+ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J*. 44: 928-938.
- Sze H, Li X and Palmgren MG. (1999)** Energization of plant cell membranes by H^+ -pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. *Plant Cell*. 11: 677-90.
- Sze H, Padmanaban S, Cellier F, Honys D, Cheng NH, Bock KW, Conejero G, Li X, Twell D, Ward JM and Hirschi KD. (2004)** Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K^+ homeostasis in pollen development. *Plant Physiol*. 136: 2532-2547.
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K and Hedrich R. (2001)** KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 2917-2921.
- Taiz L and Zeiger E (2002)** Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc.
- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J-K., and Shinozaki, K. (2004)** Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol*. 135: 1697-1709.
- Takahashi S, Katagiri T, Hirayama T, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. (2001)** Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant Cell Physiol*. 42: 214-222.
- Talke IN, Blaudez D, Maathuis FJ and Sanders D. (2003)** CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci*. 8: 286-293.
- Tang H, Vasconcelos AC and Berkowitz GA. (1995)** Evidence that plant K^+ channel proteins have two different types of subunits. *Plant Physiol*. 109: 327-330.
- Tang H, Vasconcelos AC and Berkowitz GA. (1996)** Physical association of KAB1 with plant K^+ channel α subunits. *Plant Cell* 8: 1545-1553.
- Tang H, Vasconcelos AC, Ma J and Berkowitz GA. (1998)** *In vivo* expression pattern of a plant K^+ channel β subunit protein. *Plant Sci*. 134: 117-128.
- Tang XD, Marten I, Dietrich P, Ivashikina N, Hedrich R and Hoshi T. (2000)** Histidine(118) in the S2-S3 linker specifically controls activation of the KAT1 channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J*. 78: 1255-1269.
- Tanji, K.K. (2002)** Salinity in the soil environment, pp 21-51. En: Salinity: Environment-Plant-Molecules. Editors: Läuchli A. and Lüttge U. Kluwer Academic Publishers.
- Teige M, Scheickl E, Eulgem T, Doczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL and Hirt H. (2004)** The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*. 15: 141-152.
- Tester M and Davenport R. (2003)** Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Ann Bot (Lond)*. 91: 503-527.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2006)** <http://www.arabidopsis.org>

- Thiel G and Blatt MR. (1994)** Phosphatase antagonist okadaic acid inhibits steady-state K^+ currents in guard cells of *Vicia faba*. *Plant J.* 5: 727-733.
- Thomas JC, McElwain EF and Bohnert HJ. (1992)** Convergent Induction of Osmotic Stress-Responses : Abscisic Acid, Cytokinin, and the Effects of NaCl. *Plant Physiol.* 100: 416-423.
- Thorpe C, Hooper KL, Raje S, Glynn NM, Burnside J, Turi GK and Coppock DL. (2002)** Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch. Biochem. Biophys.* 405: 1-12.
- Tilman D. (1999)** Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5995-6000
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Truksa M, Wu G, Vrinten P and Qiu X. (2006)** Metabolic engineering of plants to produce very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Transgenic Res.* 15: 131-137.
- Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K and Kobayashi H. (1999)** A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell.* 11: 1195-1206.
- Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ and Weissman JS. (2000)** Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science.* 290: 1571-1574.
- Tury A, Mairet-Coello G, Poncet F, Jacquemard C, Risold PY, Fellmann D and Griffond B (2004)** QSOX sulfhydryl oxidase in rat adenohypophysis: localization and regulation by estrogens. *J. Endocrinol* 183: 353-363.
- Tury A, Mairet-Coello G, Esnard-Feve A, Benayoun B, Risold PY, Griffond B and Fellmann D. (2006)** Cell-specific localization of the sulphhydryl oxidase QSOX in rat peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 323: 91-103.
- U.S. Salinity Laboratory Staff. (2006)** USDA-ARS <http://www.ars.usda.gov/main>
- Umbach AL, Ng VS and Siedow JN. (2006)** Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. *Biochim. Biophys Acta.* 1757: 135-142.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. (2000)** *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 11632-11637.
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T and Schroeder JI. (2000)** The *Arabidopsis* *HKT1* gene homolog mediates inward Na^+ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na^+ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* 122: 1249-1259.
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T and Shinozaki K. (1999)** A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell.* 11: 1743-1754.
- Urbach S, Chérel I, Sentenac H and Gaymard F. (2000)** Biochemical characterization of the *Arabidopsis* K^+ channels KAT1 and AKT1 expressed or co-expressed in insect cells. *Plant J.* 23: 527-538.
- Valliyodan B and Nguyen HT. (2006)** Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 189-195.
- van Anken E and Braakman I. (2005)** Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 191-228.
- Venema K, Quintero FJ, Pardo JM and Donaire JP. (2002)** The *Arabidopsis* Na^+/H^+ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na^+ and K^+ transport in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.* 277: 2413-2418.

- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Garcia-Ramirez L and Pantoja O. (2005)** Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na⁺ transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol.* 139: 1507-1517.
- Very A-A, Gaymard F, Bosseux C, Sentenac H and Thibaud J-B. (1995)** Expression of a cloned plant K⁺ channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *Plant J.* 7: 321-32
- Very AA and Sentenac H. (2002)** Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends Plant Sci.* 7: 168-175
- Very AA and Sentenac H. (2003)** Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 575-603.
- Villalobos MA, Bartels D and Iturriaga G. (2004)** Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* overexpressing the CpMYB10 transcription factor gene. *Plant Physiol.* 135: 309-324.
- Vitart V, Baxter I, Doerner P and Harper JF. (2001)** Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H⁺-ATPase in the root endodermis. *Plant J.* 27: 191-201.
- Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B and Czempinski K. (2006)** Members of the *Arabidopsis* AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta. *Plant J.* 48: 296-306.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P and Baulcombe D. (2003)** An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33: 949-956.
- Vranova E, Tahtiharju S, Sriprang R, Willekens H, Heino P, Palva ET, Inzé D and Van Camp W. (2001)** The AKT3 potassium channel protein interacts with the AtPP2CA protein phosphatase 2C. *J. Exp. Bot.* 52: 181-182.
- Waditee R, Bhuiyan MN, Rai V, Aoki K, Tanaka Y, Hibino T, Suzuki S, Takano J, Jagendorf AT, Takabe T and Takabe T. (2005)** Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 1318-1323.
- Wang R and Thorpe C. (1991)** Reactivity of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase toward molecular oxygen. *Biochemistry.* 30: 7895-7901.
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL and Fowke LC. (1998)** ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* 15: 501-510.
- Wang XQ, Ullah H, Jones AM and Assmann SM. (2001)** G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292: 2070-2072.
- Wang YH, Garvin DF and Kochian LV. (2002)** Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiol.* 130: 1361-1370.
- Wang H, Huang Z, Chen Q, Zhang Z, Zhang H, Wu Y, Huang D and Huang R. (2004)** Ectopic overexpression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol. Biol.* 55: 183-192.
- Ward JM, Cufr CA, Denzel MA and Neff MM. (2005)** The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 17: 475-485.
- Waspi U, Schweizer P and Dudler R. (2001)** Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew. *Plant Cell.* 13:153-161.
- Watson MB and Malmberg RL. (1996)** Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. *Plant Physiol.* 111: 1077-1083.

- Wegner LH and Raschke K. (1994)** Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots. A procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch clamp exploration of salt passages into xylem vessels. *Plant Physiol.* 105: 799-813.
- Wegner LH, De Boer AH and Raschke K. (1994)** Properties of the K⁺ inward rectifier in the plasma membrane of xylem parenchyma cells from barley roots: effects of TEA⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ and La³⁺. *J. Membr. Biol.* 142: 363-379.
- Wegner LH and de Boer AH. (1997)** Two inward K⁺ channels in the xylem parenchyma cells of barley roots are regulated by G-protein modulators through a membrane-delimited pathway. *Planta* 203: 506-516.
- Wegner LH and De Boer AH. (1999)** Activation kinetics of the K⁺ outward rectifying conductance (KORC) in xylem parenchyma cells from barley roots. *J. Membr. Biol.* 170: 103-119.
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF and Chory J. (2000)** Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 1003-1013.
- White PJ and Broadley MR. (2001)** Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Ann. Bot.* 88: 967-988.
- White CL, Senkevich TG and Moss B. (2002)** Vaccinia virus G4L glutaredoxin is an essential intermediate of a cytoplasmic disulfide bond pathway required for virion assembly. *J. Virol.* 76: 467-472.
- White PJ and Broadley MR. (2003)** Calcium in plants. *Ann. Bot. (Lond).* 92: 487-511.
- Wilkinson S and Davies WJ. (2002)** ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ.* 25: 195-210.
- Wittke I, Wiedemeyer R, Pillmann A, Savelyeva L, Westermann F and Schwab M. (2003)** Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 63: 7742-7752.
- Wong CE, Li Y, Labbe A, Guevara D, Nuin P, Whitty B, Diaz C, Golding GB, Gray GR, Weretilnyk EA, Griffith M and Moffatt BA. (2006)** Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal responses in *Thellungiella*, a close relative of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140: 1437-1450.
- Wu SJ, Ding L and Zhu JK. (1996)** *SOS1*, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. *Plant Cell.* 8: 617-627.
- Xia Y, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z, Patel K, Dixon RA and Lamb C. (2004)** An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO J.* 23: 980-988.
- Xicluna J, Lacombe B, Dreyer I, Alcon C, Jeanguenin L, Sentenac H, Thibaud JB and Cherel I. (2007)** Increased functional diversity of plant K⁺ channels by preferential heteromerization of the shaker-like subunits AKT2 and KAT2. *J. Biol. Chem.* 282: 486-494.
- Xiong L, Lee B, Ishitani M, Lee H, Zhang C and Zhu JK. (2001).** FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 15: 1971-1984.
- Xiong L and Zhu JK (2002)** Salt Tolerance En: The Arabidopsis Book. Editors: Somerville CR and Meyerowitz EM. American Society of Plant Biologists
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. (2002)** Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell.* 14 Suppl:S165-183.
- Xu YY, Wang XM, Li J, Li JH, Wu JS, Walker JC, Xu ZH and Chong K. (2005)** Activation of the WUS gene induces ectopic initiation of floral meristems on mature stem surface in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 57: 773-784.

- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L and Wu WH. (2006)** A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*. 125: 1347-1360.
- Yamada H, Suga Y and Takamori K. (1989)** [Reaction mechanism catalyzed by skin sulfhydryl oxidase] *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi*. 4: 499-502.
- Yamaguchi T, Apse MP, Shi H and Blumwald E. (2003)** Topological analysis of a plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 12510-12515.
- Yamaguchi T and Blumwald E. (2005)** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant. Sci.* 10: 615-620.
- Yang J and Showalter AM. (2007)** Expression and localization of AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan-protein in *Arabidopsis*. *Planta*. 226: 169-179
- Yeo AR and Flowers TJ (1986)** Salinity Resistance in Rice (*Oryza sativa* L.) and a Pyramiding Approach to Breeding Varieties for Saline Soils. *Austral. J. Plant Physiol.* 13: 161-173.
- Yeo AR, Yeo ME and Flowers TJ. (1987)** The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J. Exp. Bot.* 38: 1141-1153.
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM and Pardo JM. (2002)** Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 30: 529-539.
- Yonamine I, Yoshida K, Kido K, Nakagawa A, Nakayama H and Shinmyo A. (2004)** Overexpression of *NtHAL3* genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells. *J. Exp. Bot.* 55: 387-395.
- Zdunek E and Lips SH. (2001)** Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions *J. Exp. Bot.* 52: 1269-1276.
- Zeigler PC and Aldrich RW. (1998)** Voltage-dependent gating of single wild-type and S4 mutant KAT1 inward rectifier potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 112: 679-713
- Zerangue N, Malan MJ, Fried SR, Dazin PF, Jan YN, Jan LY and Schwappach B. (2001)** Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 2431-2436.
- Zhang X, Ma J and Berkowitz GA. (1999)** Evaluation of functional interaction between K⁺ channel α - and β -subunits and putative inactivation gating by co-expression in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Physiol.* 121: 995-1002.
- Zhang HX and Blumwald E. (2001)** Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19: 765-768.
- Zhang HX, Hodson JN, Williams JP and Blumwald E. (2001)** Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 12832-12836.
- Zhang WH, Ryan PR and Tyerman SD. (2004)** Citrate-permeable channels in the plasma membrane of cluster roots from White Lupin. *Plant Physiology* 136: 3771-3783.
- Zhu JK. (2000)** Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 941-948.
- Zhu JK. (2001)** Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66-71.
- Zhu JK. (2002)** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247-273.

Zhu JK. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 441-445.

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

Anexos

ANEXO 1: Secuencia de los cebadores empleados en este trabajo**Cebadores empleados para las PCR diagnósticas**

<i>upr1-1</i> LP (LP1)	5'-CAAGCAAGGTAAGAACTGTTCAAGC-3'
<i>upr1-1</i> RP (RP1)	5'-ACCATGCCACAGAAAACCAGC-3'
<i>par1-2</i> LP (LP2)	5'-TCAAGGCTCAGCAGACCCAAC-3'
<i>par1-2</i> RP (RP2)	5'-TGCACATGATCGATACTTTTGGTG-3'
<i>par1-3</i> LP (LP3)	5'-TTTGTTTCTCAACGGAAGGAG-3'
<i>par1-3</i> RP (RP3)	5'-TTTAGGAGGAGCCCAAAGAG-3'
<i>par1-4</i> LP (LP4)	5'-CTTGTTGTTGGGTCTGCTGAG-3'
<i>par1-4</i> RP (RP4)	5'-TGCCTATCTGCTTGTGATCC-3'
<i>qso1-1</i> LP (LP5)	5'-GCCTCAACTTTGGAGATTTCCGT-3'
<i>qso1-1</i> RP (RP5)	5'-TGAGCGAATGGAAGAAGGTCA-3'
<i>qso1-2</i> LP (LP6)	5'-GCCTCAACTTTGGAGATTTCC-3'
<i>qso1-2</i> RP (RP6)	5'-AAATGCTTGTGACGGCATTAG-3'
<i>skor</i> LP	5'-TCAAGAATCTTTAGATCCGGACAGA-3'
<i>skor</i> RP	5'-ACAGGCGCCAATTTTAGGCAT-3'
Lbb1	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'

Cebadores empleados para las RT-PCR cuantitativas

At1g15020f (20f)	5'-ACACTTGTTCTTGTTGTTGGG-3'
At1g15020r (20r)	5'-TTGGCGGGGAATCTTGAAA-3'
At2g01270f (70f)	5'-ATGTCTTTGGTGCATCTGC-3'
At2g01270r (70r)	5'-GGCGGGGGTGTCTTTAAGG-3'
Factina8	5'-AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT-3'
Ractina8	5'-GAGGATAGCATGTGGAAGTGAGAA-3'

Cebadores empleados para el rescate plasmídico

5'LB 5'-AGATTTCCGAATTAGAATAA-3'
 5'ECO 5'-GAAATGGATAAATAGCCTTGC-3'

Cebadores empleados para el análisis de cosegregación

F30 5'-TTAAATCCAGCTCCCAACAT-3'
 5'LB 5'-AGATTTCCGAATTAGAATAA-3'

Cebadores empleados para la realización de distintas construcciones**Fusión QSO2-GFP**

QSO2 XbaI (forward) 5'-TGCTTCTAGAGTAATAAACACCAGAGACCTT -3'
 QSO2 BamHI (reverse) 5'-GCGGGATCCTTCTCTCCTTTCCCTTTCACCT -3'

Fusión QSO2-3xHA-6xHIS

QSO2-MssI 5' (forward) 5'-TTATTAGGTTTAAACGTAATAAACACCAGAGAC-3'
 QSO2-MssI 3' (reverse) 5'-TATATAGGTTTAAACTTTCTCTCCTTTTCCC-3'

Cebadores empleados para la construcción de sondas

At1g15020F 5'-TCCATTTAAAAAGGCACGTGA-3'
 At1g15020r 5'-CATCTCTCCTTTTCCCTTTCA-3'

At1g15030f 5'-GGAGAGCGAAAGCGATTTTA-3'
 At1g15030r 5'-CAAAGGGTTCACGGACGTAA-3'

5'35S (forward) 5'-CAACATGGTGGAGCACGACA-3'
 3'35S (reverse) 5'-GGGATCTAGATATCACATCA-3'

3'BAR (forward) 5'-GGATCTACCATGAGCCCAGA-3'
 5'BAR (reverse) 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3'

5' Tub (forward) 5'-CCTGATAACTTCGTCTTTGG-3'
 3' Tub (reverse) 5'-GTGAACTCCATCTCGTCCAT-3'

ANEXO 2: Datos del GENEVESTIGATOR para el gen *AtQSO1*

Treatment	# of Chips	Mean	Std-Err	265739_at AT2G01270 Linear=5309 2659 Ratio	265739_at AT2G01270 Linear=5309 2659 Control	Std-Err	Mean	# of Chips	Control
Chemical: cycloheximide (+)	2	1060	32	0.47		30	2244	2	Chemical: cycloheximide (-)
Hormone: BL /H3B03 (+)	6	1771	66	0.73		142	2442	2	Hormone: BL /H3B03 (-)
Hormone: salicylic acid (+)	2	1728	55	0.77		30	2244	2	Hormone: salicylic acid (-)
Nutrient: glucose_2-4-8h	7	1877	53	0.8		76	2346	3	Nutrient: no_glucose/mannitol
Chemical: ibuprofen (+)	2	1817	82	0.81		30	2244	2	Chemical: ibuprofen (-)
Chemical: ozone_1	3	2132	139	0.82		105	2595	3	Chemical: ozone_control_1
Stress: cold_1	12	2236	55	0.82		55	2721	12	Stress: control
Chemical: hydrogen peroxide (+)	3	1528	42	0.83		38	1844	3	Chemical: hydrogen peroxide (-)
Nutrient: Nitrate_low	3	2323	171	0.84		440	2754	3	Nutrient: Nitrate_control
Light quality: blue	6	2703	89	0.84		227	3221	6	Light quality: dark
Chemical: AgNO3 (+)	2	1876	98	0.84		30	2244	2	Chemical: AgNO3 (-)
Chemical: uniconazole (+)	2	1901	3	0.85		30	2244	2	Chemical: uniconazole (-)
Hormone: ABA (+)	4	1688	121	0.85		112	1983	4	Hormone: ABA (-)
Biotic: B. cinerea (+)	6	1884	156	0.86		86	2183	6	Biotic: B. cinerea (-)
Chemical: zearalenone (+)	2	2582	75	0.87		375	2957	2	Chemical: zearalenone (-)
Hormone: MJ (+)	4	1731	88	0.87		112	1983	4	Hormone: MJ (-)
Chemical: 2,4,6 T (+)	2	1985	164	0.88		30	2244	2	Chemical: 2,4,6 T (-)
Chemical: furyl acrylate ester (+)	4	1971	19	0.88		185	2233	4	Chemical: furyl acrylate ester (-)
Light quality: UV-A	6	2848	191	0.88		227	3221	6	Light quality: dark
Chemical: brz91 (+)	2	1966	212	0.88		30	2244	2	Chemical: brz91 (-)
Light quality: UV-AB	6	2866	133	0.89		227	3221	6	Light quality: dark
Chemical: MG13 (+)	2	2007	40	0.89		30	2244	2	Chemical: MG13 (-)
Chemical: propiconazole (+)	2	2028	10	0.9		30	2244	2	Chemical: propiconazole (-)
Chemical: paclobutrazole (+)	2	2011	41	0.9		30	2244	2	Chemical: paclobutrazole (-)
Chemical: chitin (+)	6	2239	37	0.9		199	2489	3	Chemical: chitin (-)
Chemical: PNO8 (+)	2	2029	52	0.9		30	2244	2	Chemical: PNO8 (-)
Chemical: daminozide (+)	2	2040	111	0.91		30	2244	2	Chemical: daminozide (-)
Chemical: 4-thiazolidinone/acetic acid (+)	3	2029	148	0.91		185	2233	4	Chemical: 4-thiazolidinone/acetic acid (-)
Light quality: white	6	2938	132	0.91		227	3221	6	Light quality: dark
Light intensity: light_1	6	2938	132	0.91		227	3221	6	Light intensity: dark_1
Chemical: AVG (+)	2	2045	147	0.91		30	2244	2	Chemical: AVG (-)
Chemical: brz220 (+)	2	2071	76	0.92		30	2244	2	Chemical: brz220 (-)
Chemical: NPA (+)	2	2091	153	0.93		30	2244	2	Chemical: NPA (-)
Stress: cold_3	8	2159	79	0.94		257	2290	4	Stress: cold_control_3
Hormone: IAA_3	4	2088	55	0.94		185	2233	4	Hormone: IAA_control_3
Light quality: far red	6	3022	122	0.94		227	3221	6	Light quality: dark
Light quality: red	6	3042	161	0.94		227	3221	6	Light quality: dark
Hormone: GA3 (+)	4	1875	107	0.95		112	1983	4	Hormone: GA3 (-)
Hormone: BL (+)	4	1886	77	0.95		112	1983	4	Hormone: BL (-)
Chemical: prohexadione (+)	2	2153	47	0.96		30	2244	2	Chemical: prohexadione (-)
Hormone: ethylene (+)	3	1985	275	0.96		182	2058	3	Hormone: ethylene (-)
Biotic: P. syringae (+)	9	2495	180	0.96		143	2599	9	Biotic: P. syringae (-)
Hormone: zeatin (+)	4	1905	69	0.96		112	1983	4	Hormone: zeatin (-)
Chemical: PCB (+)	1	2149	0	0.96		30	2244	2	Chemical: PCB (-)
Biotic: nematode (+)	1	2782	0	0.97		0	2862	1	Biotic: nematode (-)
Biotic: E. cichoracearum (+)	4	2221	59	0.97		25	2296	4	Biotic: E. cichoracearum (-)
Nutrient: mannitol_2-4-8h	7	2289	98	0.98		76	2346	3	Nutrient: no_glucose/mannitol
Stress: wounding	12	2655	113	0.98		55	2721	12	Stress: control
Chemical: norflurazon (+)	2	3312	252	0.99		67	3350	2	Chemical: norflurazon (-)
Hormone: IAA_2	3	1832	135	0.99		75	1851	3	Hormone: IAA_control_2
Stress: heat_1	16	2699	82	0.99		55	2721	12	Stress: control
Stress: osmotic	12	2770	104	1.02		55	2721	12	Stress: control
Hormone: IAA_1	4	2048	61	1.03		112	1983	4	Hormone: IAA_control_1
Hormone: ACC (+)	4	2038	93	1.03		112	1983	4	Hormone: ACC (-)
Stress: salt	12	2793	234	1.03		55	2721	12	Stress: control
Biotic: P. infestans (+)	6	2828	285	1.05		221	2703	6	Biotic: P. infestans (-)
Stress: genotoxic	12	2890	61	1.06		55	2721	12	Stress: control
Biotic: M. persicae (+)	3	3271	65	1.06		175	3095	3	Biotic: M. persicae (-)
Stress: oxidative	12	2876	88	1.06		55	2721	12	Stress: control
Biotic: E. orontii (+)	24	2498	53	1.06		50	2353	24	Biotic: E. orontii (-)
Stress: drought	12	2906	110	1.07		55	2721	12	Stress: control
Chemical: 6-benzyl adenine (+)	2	2573	169	1.09		205	2365	2	Chemical: 6-benzyl adenine (-)
Nutrient: sucrose (+)	3	4645	247	1.13		254	4106	3	Nutrient: sucrose (-)
Nutrient: S deprivation	6	2664	119	1.16		111	2304	6	Nutrient: S control
Stress: cold_2	3	3174	428	1.33		60	2387	3	Stress: cold_control_2
Chemical: syringolin (+)	3	4847	453	2.03		97	2385	3	Chemical: syringolin (-)

ANEXO 3: Datos del GENEVESTIGATOR para el gen *AtQSO2*

Treatment	# of Chips	Mean	Std-Err	260749_at IRTIG15020 Linear 1000 500 0	Ratio	260749_at IRTIG15020 Linear 0 500 1000	Std-Err	Mean	# of Chips	Control
Nutrient: glucose_2-4-6h	7	283	20		0.44		39	637	3	Nutrient: no_glucose/mannitol
Chemical: cycloheximide (+)	2	257	35		0.59		66	438	2	Chemical: cycloheximide (-)
Hormone: ABA (+)	4	375	85		0.68		35	553	4	Hormone: ABA (-)
Stress: cold_3	8	249	37		0.69		19	360	4	Stress: cold_control_3
Stress: cold_1	12	466	55		0.7		57	662	12	Stress: control
Hormone: BL / H3BO3 (+)	6	682	17		0.71		3	955	2	Hormone: BL / H3BO3 (-)
Hormone: GA3 (+)	4	393	37		0.71		35	553	4	Hormone: GA3 (-)
Chemical: AVG (+)	2	313	30		0.71		66	438	2	Chemical: AVG (-)
Biotic: E. cichoracearum (+)	4	360	49		0.72		45	503	4	Biotic: E. cichoracearum (-)
Nutrient: Nitrate_low	3	626	27		0.77		69	815	3	Nutrient: Nitrate_control
Hormone: IAA_1	4	439	28		0.79		35	553	4	Hormone: IAA_control_1
Chemical: brz220 (+)	2	347	17		0.79		66	438	2	Chemical: brz220 (-)
Hormone: MJ (+)	4	446	30		0.81		35	553	4	Hormone: MJ (-)
Chemical: chitin (+)	6	454	28		0.83		14	546	3	Chemical: chitin (-)
Chemical: propiconazole (+)	2	366	20		0.84		66	438	2	Chemical: propiconazole (-)
Chemical: brz91 (+)	2	377	58		0.86		66	438	2	Chemical: brz91 (-)
Chemical: uniconazole (+)	2	382	25		0.87		66	438	2	Chemical: uniconazole (-)
Chemical: daminozide (+)	2	379	50		0.87		66	438	2	Chemical: daminozide (-)
Chemical: paclobutrazole (+)	2	388	29		0.89		66	438	2	Chemical: paclobutrazole (-)
Chemical: 4-thiazolidinone/acetic acid (+)	3	523	19		0.89		44	585	4	Chemical: 4-thiazolidinone/acetic acid (-)
Stress: heat_1	16	591	43		0.89		57	662	12	Stress: control
Hormone: ethylene (+)	3	559	73		0.91		114	611	3	Hormone: ethylene (-)
Hormone: zeatin (+)	4	505	103		0.91		35	553	4	Hormone: zeatin (-)
Hormone: BL (+)	4	501	19		0.91		35	553	4	Hormone: BL (-)
Hormone: salicylic acid (+)	2	403	30		0.92		66	438	2	Hormone: salicylic acid (-)
Light quality: white	6	693	44		0.92		23	753	6	Light quality: dark
Light intensity: light_1	6	693	44		0.92		23	753	6	Light intensity: dark_1
Stress: salt	12	610	30		0.92		57	662	12	Stress: control
Chemical: zearalenone (+)	2	647	124		0.93		145	699	2	Chemical: zearalenone (-)
Light quality: UV-AB	6	700	50		0.93		23	753	6	Light quality: dark
Biotic: B. cinerea (+)	6	382	29		0.93		46	412	6	Biotic: B. cinerea (-)
Light quality: blue	6	716	62		0.95		23	753	6	Light quality: dark
Light quality: far red	6	726	69		0.96		23	753	6	Light quality: dark
Chemical: prohexadione (+)	2	423	3		0.97		66	438	2	Chemical: prohexadione (-)
Chemical: 2,4,6 T (+)	2	425	22		0.97		66	438	2	Chemical: 2,4,6 T (-)
Light quality: red	6	727	31		0.97		23	753	6	Light quality: dark
Chemical: MG13 (+)	2	426	59		0.97		66	438	2	Chemical: MG13 (-)
Light quality: UV-A	6	741	35		0.98		23	753	6	Light quality: dark
Hormone: ACC (+)	4	541	71		0.98		35	553	4	Hormone: ACC (-)
Chemical: PNO8 (+)	2	429	1		0.98		66	438	2	Chemical: PNO8 (-)
Hormone: IAA_3	4	581	37		0.99		44	585	4	Hormone: IAA_control_3
Chemical: ibuprofen (+)	2	434	35		0.99		66	438	2	Chemical: ibuprofen (-)
Stress: genotoxic	12	662	34		1		57	662	12	Stress: control
Stress: osmotic	12	662	57		1		57	662	12	Stress: control
Chemical: NPA (+)	2	443	67		1.01		66	438	2	Chemical: NPA (-)
Chemical: syringolin (+)	3	347	13		1.03		35	338	3	Chemical: syringolin (-)
Stress: wounding	12	679	51		1.03		57	662	12	Stress: control
Chemical: AgNO3 (+)	2	453	45		1.03		66	438	2	Chemical: AgNO3 (-)
Chemical: 6-benzyl adenine (+)	2	608	193		1.04		15	586	2	Chemical: 6-benzyl adenine (-)
Chemical: furyl acrylate ester (+)	4	611	36		1.04		44	585	4	Chemical: furyl acrylate ester (-)
Biotic: P. syringae (+)	9	556	37		1.04		24	535	9	Biotic: P. syringae (-)
Stress: oxidative	12	689	63		1.04		57	662	12	Stress: control
Biotic: E. orontii (+)	24	433	15		1.04		18	418	24	Biotic: E. orontii (-)
Nutrient: S deprivation	6	668	39		1.05		41	635	6	Nutrient: S control
Nutrient: sucrose (+)	3	852	27		1.06		28	804	3	Nutrient: sucrose (-)
Chemical: PCB (+)	1	464	0		1.06		66	438	2	Chemical: PCB (-)
Stress: cold_2	3	572	58		1.07		59	536	3	Stress: cold_control_2
Biotic: nematode (+)	1	790	0		1.1		0	720	1	Biotic: nematode (-)
Stress: drought	12	727	51		1.1		57	662	12	Stress: control
Chemical: ozone_1	3	544	58		1.11		92	491	3	Chemical: ozone_control_1
Nutrient: mannitol_2-4-6h	7	716	28		1.12		39	637	3	Nutrient: no_glucose/mannitol
Chemical: hydrogen peroxide (+)	3	622	44		1.16		136	536	3	Chemical: hydrogen peroxide (-)
Hormone: IAA_2	3	619	61		1.16		80	533	3	Hormone: IAA_control_2
Biotic: P. infestans (+)	6	605	61		1.16		42	523	6	Biotic: P. infestans (-)
Chemical: norflurazon (+)	2	638	43		1.23		13	520	2	Chemical: norflurazon (-)
Biotic: M. persicae (+)	3	688	34		1.24		9	557	3	Biotic: M. persicae (-)

ANEXO 4: Condiciones empleadas para los diferentes tratamientos en el análisis de expresión de *AtQSO2* y *AtQSO1* en el GENEVESTIGATOR

Tratamiento con ABA: Plántulas de 7 días en medio MS líquido con 10 μ M de ácido abscísico durante 3 horas.

Tratamiento con H₂O₂: Plántulas de 5 días en medio MS líquido con 20 mM de peróxido de hidrógeno durante 1 hora.

Tratamiento de estrés salino: Plantas de 18 días en medio MS líquido con 150 mM de NaCl durante 6, 12 y 24 horas.

Tratamiento de estrés oxidativo: Plantas de 18 días en medio MS líquido con 10 μ M de metil viológeno durante 6, 12 y 24 horas.

Tratamiento de estrés osmótico: Plantas de 16 días en medio MS líquido con 300 mM de manitol durante 6, 12 y 24 horas.

Tratamiento con ciclohexamida: Plántulas de 7 días en medio MS líquido con 10 μ M de ciclohexamida durante 3 horas.

Tratamiento con ácido bórico: Cultivo de células (7 días) en medio MS (1 μ g /ml ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 3% sacarosa) líquido con 1 μ M de brasinolide y 10 μ M de ácido bórico durante 6, 8 y 10 días.

Tratamiento con ácido salicílico: Plántulas de 7 días en medio MS líquido con 10 μ M de ácido salicílico durante 3 horas.

Tratamiento con siringolina: Aplicación de 20 μ M de siringolina en las hojas

Tratamiento con frío (cold_1): Plantas de 18 días en medio MS líquido sometidas a 4 °C durante 6, 12 y 24 horas.

Tratamiento con frío (cold_2): Plantas de 43-45 días (inflorescencia 1-2 cm) en tierra sometidas a 4 °C durante 14 días.

Tratamiento con frío (cold_3): Plántulas de 10 días en medio MS sólido sometidas a 4 °C durante 1 y 24 horas.

Tratamiento de ayuno de azufre: Plántulas de 10 días en medio MGRL sólido sin sulfatos durante 6, 12 y 24 horas.

Tratamiento con glucosa: Plántulas de 8 días en medio MS líquido con 3% de glucosa durante 2, 4 y 6 horas.

Tratamiento con *Myzus persicae*: 2 hojas adultas de la roseta fueron infectadas con 10 áfidos durante 8 horas.

Tratamiento con norflurazona: Plántulas de 5 días en medio MS sólido con 5 μ M de norflurazona.

