

“Caracterización molecular del sistema SOS de halotolerancia
de *Arabidopsis thaliana* y de su homólogo en *Oryza sativa*”

Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Farmacia, **Juliana Martínez Atienza** y dirigida por el **Dr. Jose Manuel Pardo Prieto** en el Departamento de Biología Vegetal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC).

Diciembre 2006

AGRADECIMIENTOS

Un trabajo como el que aquí se presenta, siempre es el resultado sinérgico de esfuerzos individuales, institucionales y comunitarios. Una página no alcanzaría para citar a todos los que directa o indirectamente contribuyeron para obtener los resultados que a continuación se presentan, sin embargo, y corriendo el riesgo de caer en odiosas omisiones, se referencia a continuación a los pilares de esta investigación.

Al primero al que quiero expresar mi más sincera admiración y mi más profundo agradecimiento es al Dr. Jose Manuel Pardo, al que considero mi maestro y ejemplo de dedicación. Además de ser un gran director de Tesis, ha sido capaz de transmitirme su pasión por la ciencia. Quisiera agradecerle especialmente el trato recibido por su parte y el cariño y apoyo mostrados en todo momento. Realmente creo que después de estos años, además de esta Tesis, hemos conseguido crear una buena amistad. Gracias José Manuel.

Quiero agradecer muy especialmente, al Dr. Javier Quintero, maestro del trabajo bien hecho, por la inestimable ayuda y paciencia que me ha prestado durante la realización de esta Tesis, y por enseñarme una forma de trabajar que considero muy valiosa. Trabajar a su lado ha sido un orgullo y una garantía de seguridad.

Sí que me gustaría destacar aquí a mis compañeros de laboratorio, Verónica, Beatriz, Imelda y Kino, porque con su amistad y sus bromas han conseguido un verdadero clima de camaradería, alegre, distendido y bullicioso de trabajo, que se ha convertido en un apoyo fundamental a este trabajo.

A mis padres, siempre preocupados por mi felicidad, alentadores y reconfortantes en los momentos bajos y a los que es imposible pagar su cariño como se merecen. A mis hermanos cómplices y amigos, tanto en la infancia como en la madurez. Y a mi tía Águeda, por quererme tanto y estar tan orgullosa de mí como de una hija.

Finalmente a David, a quien dedico esta Tesis, quiero agradecerle la comprensión y paciencia mostradas durante todos estos años. Él es mi mejor amigo, mi marido y quien mejor me conoce y sabe lo gratificante que ha sido para mí el llevar a cabo este proyecto. Muchas de las horas aquí invertidas se las he robado a él, y a pesar de ello, me ha prestado siempre el apoyo y cariño necesarios que sólo una gran persona puede dar.

Espero no defraudaros.

0. ÍNDICE	
I. INTRODUCCIÓN	9
I. 1. El problema de la salinización del suelo en la agricultura	9
I. 2. Efectos del exceso de sal en las plantas	10
I. 3. Organismos modelos	12
I. 3. A. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	13
I. 3. B. Modelos genéticos vegetales empleados en la disección de los mecanismos de halotolerancia	13
I. 3. B. 1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo en dicotiledóneas	13
I. 3. B. 2. <i>Oryza sativa</i> como sistema modelo en monocotiledóneas	14
I. 4. Respuestas adaptativas frente a estrés salino	15
I. 4. A. Homeostasis iónica	15
I. 4. A. 1. Regulación de la distribución de Na ⁺ en la planta completa	16
I. 4. A. 1. a. Órganos especializados de desalinización	19
I. 4. A. 2. Mecanismos intracelulares reguladores de la homeostasis iónica	20
I. 4. A. 2. a. Absorción selectiva de K ⁺ frente a Na ⁺	20
I. 4. A. 2. b. Expulsión del exceso de Na ⁺ a través de la membrana plasmática	21
I. 4. A. 2. c. Compartimentación de Na ⁺ y Cl ⁻ en la vacuola	22
I. 4. B. Homeostasis osmótica: Osmolitos compatibles	23
I. 4. C. Respuesta antioxidante	23
I. 5. Sensores y vías de señalización que regulan la respuesta halotolerante	25
I. 5. A. Papel del calcio en la salinidad	27
I. 5. B. Expresión génica de respuesta al estrés abiótico	29
I. 5. C. Papel del ABA en el estrés salino	30
I. 6. Manipulación genética para la obtención de plantas halotolerantes	31
I. 7. Clasificación de los transportadores Catión/H⁺	33
I. 8. Sistema SOS de regulación de la homeostasis iónica	35
I. 8. A. Estudio filogenético y funcional del antiportador SOS1	35
I. 8. B. Regulación del sistema SOS	36
I. 8. C. Interacción de la ruta SOS con la nutrición de K ⁺	38
I. 9. Sistema CBL/CIPK de señalización celular	42

I. 9. A. Familia de kinasas CIPKs de <i>Arabidopsis</i> y arroz.....	42
I. 9. B. Familia de sensores CBLs de <i>Arabidopsis</i> y arroz.....	44
I. 9. C. Mecanismos de especificidad de la señal de calcio.....	46
II. OBJETIVOS.....	48
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
III. 1. Material biológico.....	49
III. 1. A. Material Vegetal.....	49
III. 1. A. 1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
III. 1. A. 2. <i>Oryza sativa</i>	49
III. 1. B. Estirpes usadas.....	49
III. 1. B. 1. Bacterias.....	49
III. 1. B. 2. Levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	49
III. 1. B. 2. a. <i>S. cerevisiae</i> AXT3K.....	50
III. 1. B. 2. b. <i>S.cerevisiae</i> JP890.....	50
III. 1. B. 2. c. <i>S.cerevisiae</i> JP1021.....	50
III. 2. Medios y condiciones de crecimiento.....	51
III. 2. A. Bacterias.....	51
III. 2. B. Levaduras.....	51
III. 2. C. <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
III. 2. C. 1. Crecimiento y propagación en suelo.....	52
III. 2. C. 1. a. Siembra y germinación.....	52
III. 2. C. 1. b. Parámetros de crecimiento.....	52
III. 2. C. 1. c. Recolección y conservación de semillas.....	53
III. 2. C. 2. Crecimiento y propagación <i>in vitro</i>	53
III. 2. C. 2. a. Esterilización de semillas.....	53
III. 2. C. 2. b. Medios de cultivo.....	53
III. 2. C. 2. c. Siembra y parámetros de crecimiento.....	54
III. 2. C. 2. d. Transplante a medios no estériles.....	54
III. 2. D. <i>Oryza sativa</i>	54
III. 2. D. 1. Esterilización y germinación.....	54
III. 2. D. 2. Cultivo hidropónico.....	55
III. 3. Transformación de células.....	55
III. 3. A. Vectores utilizados.....	55
III. 3. B. Transformación de <i>E. coli</i>	55
III. 3. B. 1. Preparación de células competentes. Método del crecimiento a baja temperatura.....	55

III. 3. B. 2. Transformación de <i>E. coli</i>	56
III. 3. C. Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	56
III. 3. C. 1. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	56
III. 3. C. 2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	56
III. 3. D. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	57
III. 3. D. 1. Método del acetato de litio.....	57
III. 4. Obtención de plantas transgénicas.....	57
III. 4. A. Preparación de las células de <i>A. tumefaciens</i>	57
III. 4. B. Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i>	58
III. 4. C. Selección de transformantes y propagación.....	58
III. 4. D. Presencia, expresión y número de copias del transgén.....	58
III. 4. D. 1. Presencia.....	58
III. 4. D. 2. Expresión.....	58
III. 4. D. 3. Número de copias.....	59
III. 5. Caracterización de transformantes de levadura.....	59
III. 5. A. Ensayos de tolerancia salina.....	59
III. 5. A. 1. Ensayos en medio líquido.....	59
III. 5. A. 2. Ensayos en medio sólido.....	59
III. 5. B. Cuantificación del sodio intracelular.....	60
III. 6. Caracterización de transformantes de <i>Arabidopsis</i>.....	60
III. 6. A. Ensayos de crecimiento en medio salino.....	60
III. 6. A. 1. Determinación de la elongación de raíces.....	60
III. 6. A. 2. Determinación del peso fresco.....	61
III. 6. B. Confirmación de mutantes <i>sos</i>	61
III. 6. B. 1. Confirmación de mutantes <i>sos 1-1</i>	61
III. 6. B. 2. Confirmación de mutantes <i>sos 2-2</i>	61
III. 6. B. 3. Confirmación de mutantes <i>sos 3-1</i>	62
III. 7. Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos.....	62
III. 7. A. Purificación y análisis de ADN.....	62
III. 7. A. 1. Aislamiento de plásmidos.....	62
III. 7. A. 1. a. Minipreparaciones de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	62
III. 7. A. 1. b. Minipreparaciones de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	63
III. 7. A. 1. c. Minipreparaciones de ADN plasmídico de <i>A. tumefaciens</i>	63
III. 7. A. 2. Aislamiento de ADN cromosómico.....	63
III. 7. A. 2. a. Extracción de ADN cromosómico de <i>S. cerevisiae</i>	63
III. 7. A. 2. b. Extracción de ADN cromosómico de plantas.....	63
III. 7. A. 3. Precipitación del ADN.....	64

III. 7. A. 3. a. Precipitación con Etanol-Acetato de sodio.....	64
III. 7. A. 3. b. Precipitación con Etanol-Acetato de amonio.....	64
III. 7. A. 3. c. Precipitación con Isopropanol.....	64
III. 7. A. 4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	65
III. 7. A. 4. a. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	65
III. 7. A. 5. Manipulación enzimática del ADN.....	65
III. 7. A. 5. a. Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	65
III. 7. A. 5. b. Desfosforilación de extremos 5' de ADN.....	65
III. 7. A. 5. c. Generación de extremos romos de ADN.....	66
III. 7. A. 5. d. Ligación de moléculas de ADN.....	66
III. 7. A. 6. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN.....	66
III. 7. A. 6. a. Oligonucleótidos cebadores.....	66
III. 7. A. 6. b. Amplificación con la polimerasa <i>TaqI</i>	66
III. 7. A. 6. c. Amplificación con la polimerasa de alta fidelidad <i>Pfu</i>	67
III. 7. A. 6. d. PCR a partir de colonias de bacteria.....	67
III. 7. A. 6. e. Mutagénesis dirigida mediante PCR.....	67
III. 7. B. Purificación y análisis de ARN.....	68
III. 7. B. 1. Manipulación en condiciones libres de ribonucleasas.....	68
III. 7. B. 2. Purificación de ARN total de células vegetales.....	68
III. 7. B. 2. a. Precipitación diferencial con LiCl.....	68
III. 7. B. 2. b. Método del Trizol®	68
III. 7. B. 3. Reacciones de PCR mediadas por la Transcriptasa Reversa (RT-PCR).....	69
III. 7. B. 3. a. Síntesis del cDNA monocatenario.....	69
III. 7. B. 3. b. Síntesis del cDNA bicatenario.....	69
III. 7. B. 4. Electroforesis de RNA.....	70
III. 7. C. Cuantificación de Ácidos nucleicos.....	70
III. 7. D. Hibridación de ácidos nucleicos.....	70
III. 7. D. 1. Análisis Northern (Hibridación ADN-ARN).....	70
III. 7. D. 2. Análisis Southern (Hibridación ADN-ADN).....	71
III. 7. D. 3. Sondas utilizadas.....	71
III. 7. D. 3. a. Sonda OsSOS1.....	71
III. 7. D. 3. b. Sonda 18S.....	72
III. 8. Purificación y análisis de proteínas.....	72
III. 8. A. Extracción de proteínas de bacterias.....	72
III. 8. B. Extracción de proteínas de levaduras.....	73
III. 8. B. 1. Purificación de proteínas de membrana.....	73
III. 8. B. 2. Purificación de proteínas citoplasmáticas.....	74

III. 8. C. Cuantificación de proteínas.....	74
III. 8. D. Electroforesis monodimensional de proteínas.....	74
III. 8. D. 1. Tinción de proteínas.....	75
III. 8. E. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas.....	75
III. 8. F. Desfosforilación <i>in vitro</i> de proteínas.....	75
III. 8. G. Purificación de vesículas de membrana plasmática de levadura.....	75
III. 8. G. 1. Pureza de la preparación de membranas.....	76
III. 8. G. 2. Ensayos de intercambio Na ⁺ /H ⁺	77
III. 8. H. Espectrometría de Masas.....	77
III. 9. Secuenciación.....	78
III. 10. Herramientas informáticas.....	79
III. 10. A. Programas informáticos.....	79
III. 10. B. Herramientas de internet.....	79
IV. RESULTADOS	
CAPÍTULO I: Mecanismo de activación del antiportador sodio/protón SOS1 de <i>Arabidopsis</i> por el complejo SOS2/SOS3. Búsqueda del sitio de fosforilación de SOS1 por la kinasa SOS2.	
IV/I. 1. Acotamiento preliminar del dominio de fosforilación por SOS2 mediante fosforilación <i>in vitro</i> de fragmentos carboxiterminales de SOS1.....	81
IV/I. 2. Análisis espectrofotométrico de la fusión GST:SOS1(1073-1146) para la identificación del(los) sitio(s) de fosforilación por SOS2.....	82
IV/I. 3. Caracterización molecular y funcional de los sitios putativos de fosforilación del antiportador SOS1 por la kinasa SOS2.....	84
IV/I. 3. A. Obtención de mutantes puntuales en los sitios putativos de fosforilación de SOS1 por la kinasa SOS2.....	84
IV/I. 3. B. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de los mutantes puntuales de fosforilación.....	85
IV/I. 3. C. Caracterización funcional heteróloga en <i>S. cerevisiae</i> de los mutantes puntuales de fosforilación.....	86
IV/I. 3. D. Caracterización funcional homóloga en <i>A. thaliana</i> del mutante puntual de fosforilación SOS1-S1136A/S1138A.....	88
CAPÍTULO II: Caracterización funcional del sistema SOS de halotolerancia en <i>Oryza sativa</i>.	
IV/II. 1. Clonación del antiportador de arroz OsSOS1 y análisis de su secuencia.....	91
IV/II. 2. Caracterización funcional heteróloga en <i>S. cerevisiae</i> del antiportador de arroz OsSOS1.....	92
IV/II. 2. A. Cuantificación del sodio intracelular en transformantes OsSOS1 de levadura.....	93

IV/II. 3. Cuantificación del intercambio Na^+/H^+ catalizado por OsSOS1 en vesículas de membrana plasmática de levadura.....	94
IV/II. 4. Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> de OsSOS1 por la kinasa de <i>Arabidopsis</i> AtSOS2.....	95
IV/II. 5. Complementación de mutantes <i>sos1-1</i> de <i>Arabidopsis</i> por el homólogo de arroz OsSOS1.....	95
IV/II. 6. Respuesta del transcrito <i>OsSOS1</i> al estrés salino.....	97
IV/II. 7. Identificación del complejo kinasa de arroz que active a OsSOS1.....	97
IV/II. 7. A. Identificación y caracterización funcional del homólogo de AtSOS3 en arroz.....	98
IV/II. 7. A. 1. Caracterización funcional de OsCBL4 en <i>S. cerevisiae</i>	98
IV/II. 7. A. 2. Complementación de mutantes <i>sos3-1</i> de <i>Arabidopsis</i> con el homólogo de arroz OsCBL4.....	99
IV/II. 7. B. Identificación y caracterización funcional del homólogo de AtSOS2 en arroz.....	100
IV/II. 7. B. 1. Caracterización funcional de OsCIPK24 en <i>S. cerevisiae</i>	101
IV/II. 7. B. 2. Complementación de mutantes <i>sos2-2</i> de <i>Arabidopsis</i> con el homólogo de arroz OsCIPK24.....	103
V. DISCUSIÓN.....	105
V. 1. Identificación del dominio de reconocimiento y dianas de fosforilación de SOS1 por la kinasa SOS2.....	105
V. 2. Caracterización molecular de la ruta de halotolerancia SOS de <i>Oryza sativa</i>	112
VI. CONCLUSIONES.....	118
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	119
VIII. ANEXOS.....	139
ANEXO I. Oligonucleótidos utilizados.....	139
ANEXO II. Abreviaturas.....	142

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. El problema de la salinización del suelo en la agricultura.

Se puede definir la *salinización* como un aumento en la concentración de sales, que se produce en la solución del suelo y que se manifiesta por un incremento de la conductividad eléctrica de la misma (Custodio, 1983). De entre las sales solubles presentes en los suelos los sulfatos son los que menor toxicidad presentan mientras que las sales cloradas son altamente tóxicas. En relación a los cationes, las sales sódicas presentan una toxicidad muy alta y además, en el caso de que los aniones sean carbonatos y bicarbonatos, su efecto adverso se ve aumentado por la alcalinización que originan (pH de 9.5 a 10.5) (Shainberg y Letey, 1984). El subtipo de salinización generado por Na^+ se denomina “sodicidad”. Las acepciones “estrés salino”, “salinización” o “salinidad” realizadas en este trabajo se referirán única y exclusivamente al componente sódico de las mismas.

La salinidad de los suelos puede deberse a causas naturales o ser el resultado de actividades antrópicas. Los suelos salinos son típicos de regiones de clima seco, pues dada la alta solubilidad de las sales éstas tienden a moverse bajo clima húmedo. La presencia de sales en exceso procedentes de la roca madre o de mantos freáticos salinos que suben por capilaridad a la superficie (zonas costeras), o bien por contaminación con el mar (tsunami, marismas, deltas) son típicas causas naturales de salinización. Adicionalmente la actividad agraria y sobretodo el cultivo de regadío cuando se lleva a cabo con aguas con un cierto contenido en sales (subterráneas, de embalses o ríos) son importantes causas de salinización de suelos. De las 230 millones de hectáreas mundiales dedicadas al cultivo de regadío, 45 millones están afectadas por un exceso de sales (19.5%). En cambio, de las 1500 millones de hectáreas de suelos de secano, sólo 32 millones están afectados por la salinización (2.1%) (Oldeman *et al.*, 1991). Es clásico el ejemplo de la región de Mesopotamia en la que la utilización de aguas de riego salinas condujo la pérdida de la productividad de las tierras y fue la causa de caída de la civilización sumeria hace unos 5000 años.

La salinidad es el factor abiótico con mayores consecuencias para la productividad en agricultura (Allakhverdiev *et al.*, 2000). La mayoría de las plantas de interés agronómico son glicofitas por lo que difícilmente toleran una exposición prolongada incluso a una salinidad leve. Así pues, la sodicidad del suelo ocasiona graves pérdidas en la agricultura y por ende en el desarrollo económico de los países que dependen de ella. Según el mapa mundial de suelos publicado por la FAO/Unesco, en España se calcula que unas 800.000 hectáreas están afectadas por sales. A nivel mundial la cifra se eleva a 434 millones de hectáreas cultivables, de las que una parte importante son consecuencia de las actividades agrícolas. Si no se adoptan las medidas oportunas el efecto global de la salinización puede llegar a ser devastador, con un 30% de tierras cultivables afectadas dentro de 25 años y hasta un 50% en el año 2050.

Para la remediación de suelos salinos es necesario el lavado de las sales mediante riego con aguas bajas en sales (agua de lluvia). Además, en la mayoría de los casos, es preciso el drenaje artificial del agua filtrada para evitar que ascienda el nivel freático de la zona, que aportaría nuevas sales al suelo. Para ello se instala a determinada profundidad del suelo un sistema de tubos de recogida del agua para su evacuación por unos canales de desagüe. La FAO ha desarrollado una amplia experimentación con estos sistemas de remediación en las marismas del Guadalquivir. No obstante y debido a sus elevados costes, estas estrategias resultan inviables en la gran mayoría de los terrenos (Tester y Davenport, 2003). El desarrollo de nuevas estrategias que contribuyan a la mejora de la estabilidad y rendimiento de los cultivos en terrenos salinos es por tanto un objetivo prioritario en muchas líneas de investigación actuales. Así pues, una estrategia complementaria al desarrollo de nuevos sistemas de remediación de suelos sería el incremento de la tolerancia a sal de los cultivos mediante introgresión genética usando tanto técnicas de selección tradicionales, como programas de mejora basados en los marcadores moleculares y la ingeniería genética (Hasegawa *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2001; Borsani *et al.*, 2003; Flowers, 2004).

La selección de plantas halotolerantes mediante técnicas de genética clásica conlleva un grave inconveniente y es que durante años se ha observado que la adaptación de las plantas al estrés salino induce respuestas que, aunque importantes frente a dicho estrés, afectan de un modo adverso a la productividad (Binzel *et al.*, 1985; Bressan *et al.*, 1990). Por el contrario en muchos cultivares modernos, obtenidos por procesos de mejora tradicional, se ha comprobado que el acervo genético para genes de tolerancia a la salinidad es muy limitado (Yeo y Flowers, 1986; Flowers, 2004) lo que evidencia una correlación negativa entre los *loci* responsables de los elevados rendimientos y aquellos requeridos para la tolerancia a sal (Foolad *et al.*, 2001). Se hace necesario pues el empleo de la biotecnología para la disección y manipulación de los genes implicados en los mecanismos de halotolerancia y para el estudio de su influencia sobre los procesos celulares básicos como la división, la diferenciación y la expansión celular, los cuales tienen un impacto fundamental en el crecimiento y posterior desarrollo de las plantas (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001).

I. 2. Efectos del exceso de sal en las plantas.

A diferencia de los animales, las plantas son organismos sésiles que no pueden escapar cuando las condiciones del medio se vuelven adversas y por tanto deben desarrollar mecanismos de adaptación para poder sobrevivir. Una planta que crece sobre suelos con exceso de sal se enfrenta a tres grandes dificultades: estrés osmótico, iónico (toxicidad iónica) y oxidativo. De un lado el exceso de sales desciende considerablemente el potencial hídrico del suelo (hiperosmolaridad) haciendo más difícil para la planta la absorción de agua. Esto ocasiona la deformación de la membrana plasmática y la reducción de la turgencia de la célula, lo que a su

vez restringe la expansión celular y ralentiza por tanto el crecimiento de la planta (Munns y Termaat, 1986; Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2002). Un potencial hídrico suficientemente negativo en el apoplasto podría llegar a producir pérdidas de agua capaces de mimetizar los procesos de deshidratación que ocurren en casos de extrema sequía. Por otro lado un entorno apoplástico hipersalino origina la perturbación de la homeostasis iónica celular (hiperionidad), no sólo del Na^+ y el Cl^- sino también del K^+ y del Ca^{++} (Niu *et al.*, 1995). Se produce un flujo intracelular de iones Na^+ que altera el potencial de membrana plasmática favoreciendo la entrada de anión Cl^- . Ambos iones en exceso actúan como inhibidores de muchos procesos celulares en diversos orgánulos subcelulares y en el citosol (Niu *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000). Concentraciones salinas superiores a 0.4 M son capaces de inhibir la mayor parte de las actividades enzimáticas debido a procesos de desnaturalización ya que el exceso de cargas rompe el equilibrio electrostático requerido para el mantenimiento de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas (Wyn Jones y Pollard, 1983). Así pues la toxicidad iónica es la responsable de la perturbación de la mayoría de procesos cruciales para la supervivencia de la planta como son la fotosíntesis, la síntesis de proteínas, el metabolismo energético y lipídico, etc. (Parida *et al.*, 2005). La tercera dificultad a la que se enfrentan las plantas que crecen en ambientes salinos la constituye el estrés oxidativo. Las alteraciones metabólicas originadas por la sodicidad desencadenan la producción de determinadas especies químicas, como los radicales superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) o los radicales hidroxilo (OH^\cdot) (Moran *et al.*, 1994; Borsani *et al.*, 2001b) que pueden originar daños oxidativos en las membranas y macromoléculas. Estas moléculas, conocidas globalmente como especies reactivas de oxígeno (ROS, por su acepción inglesa *Reactive Oxygen Species*), son producidas en condiciones normales en procesos celulares aeróbicos como el transporte electrónico en mitocondrias o cloroplastos, o durante los procesos de fotorespiración (Chinnusamy *et al.*, 2004). Las plantas han desarrollado varias estrategias antioxidantes para neutralizar dichas especies tóxicas que incluyen enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa, así como moléculas no enzimáticas como el ascorbato, glutatión, carotenoides y antocianinas. (Bowler *et al.*, 1992; Noctor y Foyer 1998). Así pues en condiciones de estrés salino se potencia la maquinaria celular encargada de la detoxificación de ROS para minimizar los daños celulares provocados por la salinidad.

El estrés iónico, osmótico y oxidativo generados por una elevada salinidad provocan una serie de efectos secundarios entre los que se incluyen la deficiencia de potasio (K^+), un mal funcionamiento y desorganización de las membranas celulares, la desregulación enzimática tanto de procesos fotosintéticos como de otros procesos fisiológicos, daños oxidativos por parte de las ROS y la activación de los procesos de muerte programada (Serrano *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000; Rodríguez-Navarro, 2000; Zhu, 2003; Parida *et al.*, 2005). Mientras que el sodio (Na^+) en exceso puede llegar a ser deletéreo para la planta, el K^+ es un nutriente esencial en su crecimiento

por su importante papel en el mantenimiento del equilibrio osmótico, en la apertura y cierre de los estomas y como co-factor de enzimas como la piruvato kinasa. Muchos de los transportadores y canales de membrana plasmática encargados de la toma de K^+ tienen una cierta afinidad por el Na^+ por lo que un exceso de Na^+ extracelular compite con el flujo intracelular de K^+ causando un descenso de la proporción citosólica de K^+/Na^+ y en consecuencia una deficiencia de K^+ (Niu *et al.*, 1995; Rodríguez-Navarro, 2000). En este contexto es fundamental el papel que desempeña el Ca^{++} extracelular, ya que es capaz de disminuir la toxicidad del Na^+ mediante el bloqueo su entrada a través de los canales no selectivos de cationes monovalentes tipo CNGCs (*cyclic-nucleotide gated channel*) (Maathuis *et al.*, 2001; Talke *et al.*, 2003; Gobert *et al.*, 2006). Los lípidos son el componente estructural más importante de las membranas celulares y objetivos fáciles de las reacciones de oxidación por las ROS. La oxidación de lípidos, además de ocasionar la desorganización y disfunción de las membranas celulares, genera intermediarios altamente reactivos y difíciles de eliminar capaces de modificar permanentemente proteínas y ADN (Singh, 2002). Además de bloquear la cascada de enzimas fotosintéticas, el exceso de sales reduce los contenidos totales de clorofila y carotenoides (Hernandez *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 1999) y desorganiza las estructuras tilacoidales de los cloroplastos (Hernandez *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 1999), efectos que redundan en una disminución o cese de la asimilación de CO_2 por la planta. Como consecuencia del daño oxidativo la planta aumenta la producción de proteasas, para eliminar las proteínas desnaturalizadas y evitar su agregación; y de chaperonas y proteínas tipo LEA, encargadas de proteger a las proteínas de la desnaturalización y de mantener su conformación funcional (Vierling 1991; Hendrick y Hartl 1993; Boston *et al.*, 1996; Hartl 1996; Waters *et al.*, 1996; Török *et al.*, 2001) funciones ambas cruciales para la supervivencia de la planta en condiciones de estrés.

Este conjunto de efectos moleculares de la salinidad se exteriorizan en la planta completa como una reducción del crecimiento y del área foliar, seguida de clorosis y muerte celular en las hojas más viejas. Igualmente se produce un descenso patente en la productividad que eventualmente puede desembocar en la muerte de la planta. La supresión del crecimiento es común a todas las especies de plantas, pero sus niveles de tolerancia y reducción del crecimiento varían entre las distintas especies según sus niveles de halotolerancia.

I. 3. Organismos modelos.

Un sistema modelo es un sistema simple e idealizado, fácilmente accesible y manipulable que se emplea en el estudio de sistemas más complejos y más difíciles de manejar. Cuando se seleccionan organismos vivos para utilizarlos como modelos se aplican ciertos criterios selección que dependen de los propósitos experimentales de cada trabajo, no obstante todos los organismos modelos cumplen tres características comunes fundamentales: rápido crecimiento con ciclos de vida corto, pequeño tamaño adulto y fácil disponibilidad y ductilidad (Bolker, 1995).

I. 3. A. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular ampliamente utilizado como organismo modelo en la investigación biológica. Aunque posee una complejidad genética muy superior a las bacterias, comparte muchas de las ventajas técnicas que han permitido el rápido avance en la genética molecular de los procariotas y sus virus. No obstante la levadura es un microorganismo eucariótico por lo que puede servir de modelo en el estudio de procesos celulares básicos que se conservan en eucariotas superiores, sobretodo en plantas. Algunas de las características que hacen de la levadura un organismo ideal para los estudios biológicos incluyen su rápido crecimiento en forma de células dispersas, su no-patogenicidad, su bien definido sistema genético, el elevado número de marcadores auxotróficos y genotipos desarrollados hasta hoy, y principalmente la sencillez y versatilidad con que puede ser transformada. Se puede introducir ADN en células de levaduras tanto en forma de moléculas replicativas (plásmidos), como mediante su integración en el genoma por recombinación homóloga. A diferencia con otros microorganismos, *S.cerevisiae* puede existir en estado haploide y diploide, lo que facilita el análisis genético de los alelos mutantes. Además la recombinación homóloga ha permitido la creación de una colección única de cepas disruptantes de levadura (Open Biosystems) que resulta de gran utilidad en el estudio funcional de genes de levadura y de otros organismos. Finalmente el acceso a la secuencia de nucleótidos del genoma completo de la levadura en el año 1996 ha permitido la rápida identificación de genes y el estudio de su expresión en determinadas condiciones mediante los análisis de “chips de ADN”. Por todo ello, la levadura *S. cerevisiae* ha sido en nuestro trabajo el organismo de elección para el aislamiento y caracterización inicial de los componentes del sistema SOS de plantas.

I. 3. B. Modelos genéticos vegetales empleados en la disección de los mecanismos de halotolerancia.

I. 3. B. 1. *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo en dicotiledóneas.

Arabidopsis thaliana es una planta con flor de pequeño tamaño empleada ampliamente como modelo de estudio en biología de plantas. Pertenece a la familia de las Brassicáceas, que incluye especies como la col o el rábano y, aunque su importancia agronómica es escasa, ofrece grandes ventajas para la investigación básica en genética y biología molecular. Su importancia radica no sólo en su pequeño tamaño, su corto período de generación (aproximadamente 6 semanas) o los miles de semillas que se obtienen de cada planta, sino también en el reducido tamaño de su genoma (sólo cinco cromosomas) que lo hace ideal para el mapeo genético y ha facilitado su completa secuenciación en el año 2000. Adicionalmente su transformación con *Agrobacterium tumefaciens* es muy sencilla y eficiente lo cual no sólo supone una ventaja en sí misma, sino que ha permitido la creación de una importante colección de mutantes por inserción de T-ADN (SIGnAL). *Arabidopsis* es una planta glicófita y muy sensible a la inhibición del

crecimiento y al daño producido por la sal, por lo que se podría pensar que no es un modelo adecuado para el estudio de los mecanismos de tolerancia a salinidad. Sin embargo, las diferencias entre glicófitas y halófitas parecen ser cuantitativas más que cualitativas, y los mecanismos básicos de tolerancia a sal parecen estar conservados en ambos grupos (Hasegawa *et al.*, 1994). De hecho la aplicación de las herramientas moleculares existentes en *Arabidopsis* ha permitido un progreso sin precedentes en la identificación de los determinantes de tolerancia a estrés salino, incluyendo componentes de las cascadas de señalización que controlan las respuestas de la planta a elevada salinidad (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2000; 2002; 2003; Bressan *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003). Adicionalmente la relativa variabilidad en la sensibilidad a sal de los distintos ecotipos de *Arabidopsis* podría ser de gran utilidad en la identificación de los QTLs (del inglés Quantitative Trait Loci) responsables de dichas diferencias en la halotolerancia.

I. 3. B. 2. *Oryza sativa* como sistema modelo en monocotiledóneas.

El arroz es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las Poáceas y cuyo cultivo proporciona un comestible que constituye la base de la dieta en el continente asiático. Todas las formas cultivadas de arroz pertenecen a la especie *Oryza sativa* (arroz asiático), y minoritariamente a *Oryza glaberrima* (arroz africano). Dentro de la especie *O. sativa* se diferencian dos grupos de variedades o subespecies denominadas *Japónica* e *Indica*. Las variedades pertenecientes al grupo *Japónica* se distinguen por unos granos más cortos y redondeados y se cultivan típicamente en países de clima templado como Japón, Corea, Norte de China, Australia y Europa. Las variedades del grupo *Indica* producen unos granos más alargados y estrechos y se cultivan típicamente en países de clima tropical y sub-tropical como India, Pakistán, Tailandia, Vietnam, Filipinas, Sudamérica y África. Diversas razones han favorecido la elección del arroz (*Oryza sativa*) de entre los demás cereales, para su secuenciación genómica completa. En primer lugar se trata de una planta diploide y su genoma es el más pequeño de todos los cereales, con sólo 430 millones de nucleótidos. El genoma de otros cereales de interés agronómico como el maíz y el trigo es cinco y hasta 40 veces mayor que el del arroz. No obstante, comparaciones preliminares entre los diferentes genomas de cereales revelaron amplios bloques de genes homólogos con un orden relativamente conservado. Este fenómeno, denominado sintenia, hace del arroz un buen punto de partida para la caracterización de genes de otros cereales y para su asociación a diversos atributos agronómicos. Así pues, el arroz puede servir como organismo modelo para el grupo de las monocotiledóneas, de la misma forma que *Arabidopsis thaliana* es el organismo modelo de las dicotiledóneas. El estudio del arroz es además interesante en sí mismo pues este cereal constituye el alimento básico de más de la mitad de la humanidad y su cultivo representa más del 30% de la producción mundial de cereales. El estatus de organismo modelo en el arroz se apoya asimismo en la existencia de numerosos

recursos y técnicas para su estudio, como por ejemplo mapas genómicos excelentes y eficientes técnicas para su transformación genética. Finalmente la existencia de un elevado número de variedades y cultivares adaptadas a muy diversas condiciones ambientales es una herramienta de gran utilidad en la búsqueda de los QTLs responsables de dicha variabilidad.

I. 4. Respuestas adaptativas frente a estrés salino.

Las plantas, tanto halofitas como glicofitas, son incapaces de tolerar elevadas cantidades de sales en el citoplasma por lo que han desarrollado un abanico de mecanismos moleculares y bioquímicos que se coordinan y actúan sinérgicamente en la adaptación de la planta al estrés salino (Hasegawa *et al.*, 2000).

Un factor fundamental que determina la halotolerancia de una planta es el mantenimiento de una correcta homeostasis iónica y osmótica a nivel intracelular. La homeóstasis iónica requiere el funcionamiento y coordinación de procesos que sean capaces de controlar la adquisición del Na^+ y de facilitar su compartimentación en la vacuola (Niu *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2003). La vacuola es un compartimento clave para la expansión celular pues la acumulación iónica en dicho orgánulo facilita el ajuste osmótico que requiere el crecimiento, minimizando a su vez la toxicidad iónica en el citosol y en el resto de los orgánulos. La regulación de la homeostasis osmótica a nivel intracelular se realiza mediante la acumulación de osmolitos compatibles en el citosol (Hasegawa *et al.*, 2000). Menos conocidos son los procesos que se llevan a cabo a nivel de tejidos y organismo completo para el mantenimiento del balance iónico y osmótico. Por ejemplo, existe una coordinación entre raíces y parte aérea que moviliza los iones tóxicos para su almacenamiento en tejidos metabólicamente inactivos (glicofitas) o glándulas de secreción especializadas (halofitas) (Zhu, 2003), alejándolos de los meristemos y de células metabólicamente activas, no obstante los mecanismos moleculares involucrados en dichas respuestas aún no se conocen totalmente (Munns, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003). Por tanto, el establecimiento de la homeostasis iónica y osmótica posterior a un estrés salino es esencial para estabilizar los estados fisiológicos y bioquímicos necesarios para el crecimiento y el desarrollo del ciclo vital de la planta (Bohnert *et al.*, 1995).

I. 4. A. Homeostasis iónica.

El potasio es el catión monovalente preferido por todas las células vivientes, sin embargo en muchos ambientes terrestres la disponibilidad de K^+ es limitada y a menudo restringe el crecimiento potencial de muchas plantas. El sodio en cambio es un catión ubicuo pero no esencial que puede resultar tóxico para muchas especies vegetales cuando se presenta en elevadas concentraciones (Hasegawa *et al.*, 2000). La mayoría de las células mantienen una concentración relativamente elevada de K^+ y baja de Na^+ en el citosol y esta homeostasis intracelular de K^+ y Na^+ es crucial para la actividad de muchas enzimas citosólicas, y para el mantenimiento del equilibrio

osmótico que determina el volumen celular. La membrana plasmática de las células vegetales presenta en condiciones fisiológicas un potencial eléctrico interior negativo que oscila entre los -120 y los -200 mV (Niu *et al.*, 1995; Hirsch *et al.*, 1998; Borsani *et al.*, 2001a; Rubio *et al.*, 2004) y que favorece el transporte pasivo de ambos cationes monovalentes (K^+ o Na^+) al citosol. Cuando la concentración de Na^+ aumenta en el medio extracelular, el potencial de membrana sumado al diferencial de concentraciones de Na^+ entre ambos compartimentos establecen un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática que favorece el influjo pasivo de Na^+ al citosol (Niu *et al.*, 1995). La entrada de Na^+ a favor de gradiente podría elevar la concentración citosólica de dicho ión en > 100 veces comparada con la concentración apoplástica (Niu *et al.*, 1995), hecho que podría afectar negativamente al estado fisiológico de la célula, pudiendo incluso llegar a inducir su apoptosis (Serrano *et al.*, 1999). Así pues en condiciones de estrés salino el mantenimiento de la homeostasis iónica intracelular y de las concentraciones apoplásticas de iones es fundamental para el normal desarrollo de la planta, y la capacidad para mantener dicha homeostasis es un determinante directo del grado de halotolerancia de la planta.

I. 4. A. 1. Regulación de la distribución de Na^+ en la planta completa.

La homeostasis iónica global en la planta completa requiere una coordinación precisa entre los mecanismos intrínsecamente celulares y aquellos que operan a nivel intercelular, en tejidos y órganos (Flowers *et al.*, 1977; 1986; Greenway y Munns, 1980; Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002; Munns *et al.*, 2002). Para alcanzar este ajuste, procesos como el transporte de Na^+ desde la raíz, la redistribución del exceso de Na^+ a la parte aérea para su acumulación en hojas viejas y glándulas salinas, y la recirculación del exceso de Na^+ desde la parte aérea a través del floema para su secreción en la raíz (Munns, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003) se coordinan con los procesos reguladores de los niveles de Na^+ intracelulares evitando así que alcance niveles tóxicos que pudieran interferir con procesos celulares vitales como la fijación del carbono y la asimilación de nutrientes.

La absorción del Na^+ tiene lugar inicialmente a nivel de las células epidérmicas y corticales de la raíz. En base a estudios bioquímicos y electrofisiológicos se han propuesto tres rutas alternativas para la absorción del Na^+ por la planta (Tester y Davenport, 2003). Dos de ellas, de tipo simplástico, están mediadas por transportadores y se pueden distinguir por su relativa sensibilidad al calcio extracelular. La tercera vía, denominada “flujo de desvío”, se atribuye a la filtración a través del apoplasto debida a discontinuidades en la endodermis. Las células endodérmicas constituyen un importante punto de control y regulación del transporte radicular de iones desde la solución del substrato debido a que la banda de células suberizadas de Caspari es una barrera impermeable para el movimiento apoplástico de solutos (Azaizeh y Steudle, 1991; Cruz *et al.*, 1992; Niu *et al.*, 1995; Amaya *et al.*, 1999) que por lo tanto obliga a que el movimiento de agua e iones se realice de un modo simplástico. Sin embargo la existencia de un movimiento

importante de iones a través de áreas de la raíz en las cuales la endodermis no se encuentra totalmente desarrollada (ápice de la raíz, inicios de raíces secundarias) pueden ser importantes puntos de entrada de iones (Yadav *et al.*, 1996; Yeo *et al.*, 1999). La contribución relativa de cada vía de absorción es variable en función de la especie y las condiciones de crecimiento. El flujo de desvío es particularmente aparente en algunas especies de cereales como el arroz (Yeo *et al.*, 1986) donde la variabilidad natural en la tolerancia salina entre los distintos cultivares está en parte determinada por ciertos QTLs que controlan caracteres del desarrollo vegetativo de la planta (Koyama *et al.*, 2001). Con respecto al transporte simplástico de Na^+ , como se ha comentado anteriormente, el gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana plasmática de las células vegetales favorece su transporte pasivo al citosol. Pese a que la identidad exacta de los transportadores implicados en la absorción de Na^+ aún no es clara, datos bioquímicos y electrofisiológicos apuntan a la actividad de los transportadores de alta afinidad de K^+ de tipo HKT (Rubio *et al.*, 1995; Rus *et al.*, 2001; Máser *et al.*, 2002), a los canales no selectivos de cationes (NSCCs) (Amtmann y Sanders, 1999) y a los transportadores de cationes de baja afinidad como LCT1 (Schachtman *et al.*, 1997). No obstante estos no son los únicos mecanismos propuestos ya que la adquisición de Na^+ a través de la membrana plasmática ha sido también atribuida a sistemas de transporte de alta afinidad de K^+ como los KIRCs (del inglés *K⁺ inward rectifying channels*) entre los que se incluye AKT1, los KORCs (del inglés *K⁺ outward rectifying channels*) y la familia de cotransportadores K^+/H^+ del tipo KUP/HAK (Maathuis y Amtmann, 1999; Blumwald *et al.*, 2000). Una vez alcanzado el citoplasma, el Na^+ se desplaza a través de las conexiones intercelulares (plasmodesmos) hasta las células de la estela radical donde de nuevo abandona el simplasto mediante su eflujo a través de la membrana plasmática hacia el espacio apoplástico del xilema, donde será conducido hasta la parte aérea de la planta. El transporte del Na^+ a través del xilema tiene lugar a favor del flujo transpiracional, es decir el movimiento de agua conducida por la evaporación (o transpiración) final a nivel de las hojas. Una respuesta primaria a una elevada carga de iones en el xilema es la reducción del flujo transpiracional mediante el cierre estomático. Esta respuesta es sin embargo efectiva sólo a corto plazo pues el cierre estomático limita funciones tan vitales como el control del balance hídrico, la fijación del carbono y el transporte de solutos en la planta (Hasegawa *et al.*, 2000). Tras la llegada al espacio apoplástico foliar, el Na^+ es transportado a través de la membrana plasmática celular para su compartimentación en la vacuola. A este nivel se produce una redistribución del Na^+ que tiende a acumularse preferentemente a nivel de las hojas senescentes (y metabólicamente menos activas) y, en algunas especies de halofitas, en glándulas salinas especializadas que actúan como sumideros de sodio (Flowers *et al.*, 1977; 1986). Se ha propuesto también una redistribución del Na^+ a través del floema que evitaría la acumulación de niveles citotóxicos de Na^+ en células jóvenes y metabólicamente más activas y que puede ser crítica para el normal crecimiento y desarrollo de la planta (Greenway y Munns, 1980; Jeschke, 1984; Munns, 2002).

El patrón de contenidos iónicos del mutante *sos1* de *Arabidopsis* y la expresión preferencial de *SOS1* en las células parenquimáticas que rodean al xilema son resultados que confirman el papel de este antiportador Na^+/H^+ en el transporte de Na^+ a larga distancia en la planta. Cuando crecen en presencia de un exceso de Na^+ (100 mM NaCl), las raíces y parte aérea de plantas de *Arabidopsis* mutantes *sos1* acumulan más Na^+ que las plantas silvestres; en cambio, en respuesta al estrés salino moderado (25 mM NaCl), el contenido de Na^+ del mutante *sos1* es considerablemente inferior al encontrado en la planta silvestre (Ding y Zhu, 1997; Shi *et al.*, 2002). Este resultado en principio discrepante, se puede explicar en base al papel que representa el antiportador *SOS1* en la carga de sodio al torrente xilemático. Cuando la salinidad es moderada, *SOS1* funcionaría cargando Na^+ en el xilema de la raíz para su distribución controlada a la parte aérea y su almacenamiento en las células del mesófilo de la hoja. En condiciones de estrés salino severo, el Na^+ podría acumularse rápidamente en la parte aérea, saturando la capacidad de la vacuola para compartimentar dichos iones. En estas condiciones, *SOS1* retrasaría la descarga de Na^+ desde el xilema mediante el eflujo de Na^+ desde las células del parénquima xilemático, posibilitando así una velocidad neta de acumulación de Na^+ que sea conmesurada con su compartimentación en las vacuolas (Shi *et al.*, 2002). Por otra parte, análisis genéticos y electrofisiológicos indican que el transportador de *Arabidopsis* *AtHKT1*, podría estar asimismo implicado en el transporte de Na^+ a larga distancia en la planta (Sunarpi *et al.*, 2005; Berthomieu *et al.*, 2003). La expresión del gen *AtHKT1* se localiza en la membrana plasmática de las células parenquimáticas del xilema (y posiblemente también del floema) de raíces y hojas (Sunarpi *et al.*, 2005; Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003) (Figura 5). La disrupción de *AtHKT1* en plantas de *Arabidopsis* origina un aumento significativo en el contenido neto de Na^+ en la parte aérea que se acompaña de una reducción concomitante de sus niveles en la raíz (Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Rus *et al.*, 2004). Estos datos son consistentes con el papel de *AtHKT1* en la descarga selectiva de sodio desde los vasos del xilema hacia sus células parenquimáticas para su almacenamiento vacuolar y/o su recirculación floemática desde la parte aérea a la raíz, protegiendo de este modo al tejido foliar del estrés salino (Sunarpi *et al.*, 2005). Así pues el mutante de *Arabidopsis* carente de la actividad transportadora de *HKT1* es deficiente en la recirculación del Na^+ a través del floema y en su descarga desde los vasos del xilema y por consiguiente su sensibilidad a sal es debida a la excesiva acumulación de Na^+ en el tallo y las hojas. No obstante es un hecho desconcertante que la mutación *hkt1* se aislara como un supresor extragénico de la hipersensibilidad a sal del mutante *sos3* (Rus *et al.*, 2001). *SOS3* es una proteína que une calcio que interacciona y activa a la proteína quinasa *SOS2* que, a su vez, fosforila y estimula al intercambiador Na^+/H^+ de membrana plasmática *SOS1*. La mutación de cualquiera de los genes *SOS* (*SOS1*, *SOS2* o *SOS3*) aumenta la absorción neta de Na^+ y genera un fenotipo mutante de halosensibilidad (Zhu, 2003). La disrupción de *HKT1* en un mutante *sos3* reduce la acumulación neta de Na^+ y alivia su fenotipo de deficiencia de K^+ cuando crece en medios pobres en Ca^{++} (0.15

mM) y K^+ (<200 μ M) (Mäser *et al.*, 2002; Rus *et al.*, 2001, 2004). Estos resultados indican que AtHKT1, más que favorecer la nutrición de K^+ , actúa como un efector negativo pues su supresión resulta en una mejora, más que una exacerbación, del fenotipo de deficiencia de K^+ del mutante *sos3* (Rus *et al.*, 2001), y pueden ser interpretados en el contexto del transporte a larga distancia y recirculación del Na^+ en *Arabidopsis*. En el mutante *sos3*, la extrusión de Na^+ en la raíz está deteriorada debido a la insuficiente actividad de SOS1 en la epidermis radicular (Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002). SOS1, al igual que HKT1, se expresa preferentemente en las células parenquimáticas del xilema, donde contribuye a la carga de Na^+ a los vasos del xilema para su transporte a la parte aérea a razón del flujo transpiracional (Shi *et al.*, 2002). Consecuentemente en los mutantes *sos1* y *sos3* se produce una sobreacumulación de Na^+ en la estela de la raíz (Shi *et al.*, 2002; Zhu, 2003) donde la deposición incremental de Na^+ mediante su descarga del xilema jugaría en su detrimento y se evitaría mediante la inactivación del transportador AtHKT1 (Sunarpi *et al.*, 2005). De hecho los mutantes aislados *sos3* y *hkt1* exhiben acumulación de Na^+ en raíces y parte aérea, respectivamente, en tanto que el doble mutante *sos3 hkt1* demuestra una partición de Na^+ más balanceada que se acerca más al perfil encontrado en plantas silvestres (Rus *et al.*, 2004). Este modelo también explica la interacción fenotípica entre los mutantes *sos3* y *hkt1* en relación a la nutrición de K^+ , hecho que se discute más detalladamente en el apartado I.8.C. de esta Tesis.

I. 4. A. 1. a. Órganos especializados de desalinización.

Dependiendo de su nivel de tolerancia a sal las plantas se pueden clasificar en dos grandes grupos: halofitas y glicofitas. Tanto las plantas que son nativas de ambientes salinos (halofitas) como las que no lo son (glicofitas) utilizan mecanismos comunes, a nivel celular y de organismo completo, para tolerar la sal (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2003), si bien algunas halofitas (halofitas secretivas) han desarrollado evolutivamente diversas estructuras morfológicas de adaptación a ambientes salinos denominadas glándulas de sal (Adams *et al.*, 1998; Tester y Davenport, 2003). Se trata de estructuras de muy diversa morfología capaces de secretar el exceso de sales del apoplasto foliar a la superficie de la hoja, donde la cutícula cerosa las aísla del conjunto de células del mesófilo. La secreción se realiza generalmente mediante el bombeo activo de sales a un compartimiento aislado del apoplasto foliar, lo que crea un potencial osmótico negativo que fomenta el influjo de agua y provoca un aumento progresivo de la presión hídrica que termina por romper la débil membrana que separa dicho compartimiento con la superficie foliar para liberar su contenido salino a la superficie de la hoja (Tester y Davenport, 2003). Las glándulas salinas se han encontrado en un reducido grupo de plantas de origen evolutivo muy diverso y sus estructuras son complejas y muy variadas. Muchas gramíneas poseen pequeñas glándulas bicelulares en las hojas cuya capacidad secretora de sales ha demostrado una correlación directa con la halotolerancia de la planta (Marcum, 1999). En efecto, el arroz silvestre *Porteresia coarctata* tiene glándulas

halosecretoras en sus hojas y es capaz de crecer en un 25% de agua de mar (Flowers *et al.*, 1990). Halofitas de ambientes secos como *Atriplex* spp. (Quenopodiáceas) presentan un tipo especial de glándulas salinas llamadas “tricomas salinos” formados por un pedúnculo que sujeta a una célula hinchada denominada “célula vesical” que acumula sales y agua en su vacuola hasta finalmente estallar vertiendo su contenido salino sobre la superficie de la hoja. Otro sistema de expulsión del exceso de sales es mediante la gutación a través de los hidatodos. Éste es un sistema muy común en las hojas de cereales y se produce cuando las condiciones ambientales dificultan la transpiración foliar.

I. 4. A. 2. Mecanismos intracelulares reguladores de la homeostasis iónica.

Como se ha comentado anteriormente (apdo. I.2) un exceso de Na^+ en el citosol puede resultar nocivo para la célula pues interfiere con la mayoría de los procesos celulares críticos para la supervivencia de la planta (fotosíntesis, síntesis de proteínas, metabolismo energético y lipídico etc.) e induce la producción de ROS que podrían infligir daños irreversibles en membranas y macromoléculas (proteínas, ADN). El control de la homeostasis iónica a nivel intracelular es pues esencial y está regulado a través de un control coordinado tanto de la entrada de Na^+ como de su compartimentación en la vacuola y su expulsión activa al medio extracelular (Niu *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1999; Blumwald 2000; Hasegawa *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003; Zhu, 2003).

I. 4. A. 2. a. Absorción selectiva de K^+ frente a Na^+ .

La capacidad de las plantas para mantener una correcta relación K^+/Na^+ en el citosol es un proceso crucial para su tolerancia a sal (Läuchli, 1990; Amtmann y Sanders, 1999; Maathuis y Amtmann, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2002; 2003). El modo mediante el cual las plantas regulan la absorción selectiva de K^+ frente a Na^+ es aún objeto de debate, pero hay datos tanto fisiológicos como moleculares que han identificado algunos de estos mecanismos. El ión Na^+ , particularmente a las elevadas concentraciones a las que se encuentra en los suelos salinos, interfiere con la adquisición de K^+ , llegando a producir una deficiencia en este elemento que es esencial para el desarrollo vegetal. Como se ha comentado previamente, se postula que el Na^+ compite con el K^+ por los sitios de unión a los sistemas de transporte de alta y baja afinidad (Maathuis *et al.*, 1996; Rains y Epstein, 1967). Los canales de cationes no selectivos (AtCNGC1 y otros) han sido propuestos como mediadores en la absorción de una parte importante del Na^+ que penetra a nivel de la raíz (Amtmann y Sanders, 1999; Tyerman y Skerrett, 1999). A este nivel, el ión Ca^{++} representa un papel muy importante puesto que facilita la acumulación selectiva de K^+ frente a Na^+ (Epstein, 1961; 1998; Läuchli, 1990; Niu *et al.*, 1995; Zhu, 2003; Rus *et al.*, 2004) mediante la inhibición de los canales NSCC, lo que reduce la absorción neta de Na^+ de la planta y mejora por consiguiente su halotolerancia. Por otro lado los niveles de transcrito de diversos

transportadores de K^+ aumentan o disminuyen por el estrés salino, probablemente para mantener una adecuada absorción de K^+ en situaciones de estrés salino. El estrés por sal aumenta los niveles de transcrito del transportador de K^+ de *Arabidopsis* AtKC1 (Pilot *et al.*, 2003). En plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* la expresión de *KMT1* (un miembro de la familia AKT/KAT de transportadores de K^+) y de varios transportadores de tipo *HAK/KUP* (transportadores de K^+ de alta afinidad) aumenta en respuesta al estrés salino. En cambio, la expresión de *MKT1* (otro miembro de la familia AKT/KAT) disminuye (Su *et al.*, 2001; 2002). A nivel de actividad, los canales de K^+ se regulan por proteínas-kinasas (Li *et al.*, 1998) y fosfatasa (Cherel *et al.*, 2002). Estudios recientes demuestran que el canal de K^+ AKT1 se activa de manera similar al modelo de activación descrito para SOS1, mediante fosforilación directa por el complejo kinasa CIPK23/CBL1-9 en respuesta a una señal de calcio (Xu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006).

I. 4. A. 2. b. Expulsión del exceso de Na^+ a través de la membrana plasmática.

En plantas multicelulares el papel del eflujo celular de Na^+ no es intuitivo pues el Na^+ expulsado al apoplasto podría representar una amenaza para las células vecinas; por lo tanto la extrusión celular del exceso de Na^+ debe ser considerada en tejidos específicos y en el contexto de la planta completa. En condiciones fisiológicas, el gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana plasmática establece que el influjo de este ión es pasivo y no precisa de energía, y que en cambio su eflujo se realiza en contra de dicho gradiente y por consiguiente requiere un gasto de energía (transporte activo). Las plantas, a diferencia de los animales y hongos, carecen de ATPasas de $Na^+/(K^+)$, por lo tanto la extrusión de Na^+ del citosol se alcanza mediante la actividad de antiportadores Na^+/H^+ de membrana plasmática que actúan expulsando el exceso de Na^+ citosólico de manera acoplada a la disipación del gradiente de protones generado por las H^+ ATPasas de membrana plasmática. Estas bombas de H^+ son ATPasas de tipo P que establecen una diferencia de pH a través de la membrana plasmática de alrededor de 1.5 a 2 unidades (pH 5.5 a 5.0 en el apoplasto) y son las principales responsables del potencial de membrana de -120 a -200 mV en condiciones fisiológicas. En *Arabidopsis*, el eflujo de Na^+ está catalizado por el antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática codificado por el gen *SOS1* (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002) que fue inicialmente identificado mediante un cribado de mutantes hipersensibles a cloruro sódico (Wu *et al.*, 1996). La actividad del promotor de *SOS1* se detecta en la mayoría de tejidos vegetales pero es más intensa en las células epidérmicas de la punta de la raíz y en las células que rodean los vasos del xilema (Shi *et al.*, 2002). Además del ya mencionado papel de SOS1 en la carga y descarga de Na^+ del xilema para su transporte a larga distancia, a nivel celular SOS1 representa un importante papel en el eflujo de Na^+ que ralentiza la acumulación de Na^+ en el citosol para así dar tiempo a su compartimentación en la vacuola. Además a nivel del ápice de la raíz, donde la endodermis aún no está completamente desarrollada, SOS1 actúa expulsando el exceso de Na^+ que penetra en la célula, evitando así su transporte

apoplástico al xilema. Las características de funcionamiento y regulación de este sistema transportador se detallan más extensamente en el apartado I.8.

I. 4. A. 2. c. Compartimentación de Na⁺ y Cl⁻ en la vacuola.

Numerosos datos experimentales han llevado a la conclusión de que la compartimentación vacuolar del Na⁺, además de ser un proceso crucial para la expansión celular y el crecimiento, es de un mecanismo muy eficaz para proteger a las células de la toxicidad por Na⁺ (Hasegawa *et al.*, 2000). La compartimentación vacuolar del Na⁺ es un mecanismo adaptativo conservado en halófitas y glicófitas que se relaciona de manera directa con el grado de halotolerancia de cada especie. Recientemente, se han obtenido evidencias directas en varias especies vegetales, incluyendo *Arabidopsis*, de que una mejora en la capacidad celular de compartimentación del Na⁺ en la vacuola resulta en un incremento de la tolerancia salina de la planta (Apse *et al.*, 1999; Zhang y Blumwald 2001). Otros orgánulos subcelulares como los plástidos o la mitocondria, pueden también acumular Na⁺ y por lo tanto contribuyen a la compartimentación subcelular global del Na⁺ citoplasmático. No obstante la mayor parte del exceso de Na⁺ que penetra en la célula vegetal es compartimentalizado en la vacuola mediante la acción de antiportadores Na⁺/H⁺ vacuolares (Gaxiola *et al.*, 1999; Apse *et al.*, 1999) utilizando la fuerza protonmotriz generada por la H⁺ATPasa (tipo V) y la H⁺ pirofosfatasa vacuolares (Sze *et al.*, 1999; Rea *et al.*, 1993). Ambas bombas de protones vacuolares establecen un gradiente de pH a través de esta membrana de aproximadamente 2 unidades entre el citosol y el interior de la vacuola y un potencial de membrana de -50 a -100 mV (negativo en el citoplasma). En *Arabidopsis*, los antiportadores Na⁺/H⁺ de clase I de la familia de los NHXs parecen ser los principales responsables de la compartimentación vacuolar del Na⁺ (Blumwald 2000; Pardo *et al.*, 2006). AtNHX1 y AtNHX2 se localizan en la membrana del tonoplasto y sus niveles de transcrito se incrementan en presencia de ABA o estrés osmótico (Yokoi *et al.*, 2002) pero son independientes de la ruta SOS (Shi y Zhu, 2002). La sobreexpresión de los antiportadores NHX o de la H⁺ pirofosfatasa vacuolar de *Arabidopsis* (Gaxiola *et al.*, 2001) son estrategias empleadas con éxito en la mejora de la tolerancia salina de varias especies de plantas (Apse *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 2004; Ohta *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2004; Zhang y Blumwald 2001; Zhang *et al.*, 2001). Su afinidad dual por Na⁺ y K⁺ implica que bajo condiciones normales de crecimiento los transportadores NHX de clase I pueden mediar en la acumulación de K⁺ y Na⁺ en la vacuola en intercambio por protones (Venema *et al.*, 2002; Pardo *et al.*, 2006). Esta capacidad de intercambio de cationes alcalinos por H⁺ sugiere que los antiportadores Na⁺/H⁺ vacuolares están también implicados en el control del pH vacuolar, en el almacenamiento de K⁺ en la vacuola, en el control del volumen celular y en la generación osmótica de la turgencia necesaria para la expansión celular (Carden *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2006).

I. 4. B. Homeostasis osmótica: Osmolitos compatibles.

Una respuesta universal a los cambios en el potencial osmótico externo es la acumulación de metabolitos que actúan como osmolitos “compatibles”, es decir que reestablecen la turgencia de la célula alterada por el descenso del potencial hídrico, sin por ello interferir con las reacciones bioquímicas normales del metabolismo celular (Yancey *et al.*, 1982; Hasegawa *et al.*, 2000). Dentro de unos límites determinados por cada especie, la acumulación de osmolitos compatibles es proporcional al cambio del potencial osmótico externo, permitiendo con ello un flujo intracelular continuo de agua necesario para la adaptación al estrés osmótico (Delaunay y Verma, 1993; McCue y Hanson, 1990). De hecho la sobreexpresión de estos osmolitos compatibles en plantas transgénicas puede resultar en una mejora de la tolerancia al estrés salino y otros estreses abióticos (Vinocur y Altman, 2005). Existen distintas clases de osmolitos compatibles como los azúcares (mayoritariamente fructosa y sacarosa), los azúcares alcoholes (glicerol, inositoles metilados), los azúcares complejos (trehalosa, rafinosa y fructanos), los metabolitos cargados (glicilbetaína) los aminoácidos (prolina) e incluso iones (K^+) (Hasegawa *et al.*, 2000; Chen y Murata, 2002) (Figura 1).

Estudios recientes indican que los osmolitos compatibles pueden tener funciones secundarias al ajuste osmótico y actuar como chaperonas químicas, estabilizando directamente las membranas y estructuras proteicas, evitando así su desnaturalización por el exceso de cargas (Hare *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1999; Diamant *et al.* 2001). Esta capacidad osmoprotectora se explica en base a la naturaleza hidrofílica de estos metabolitos que les permite reemplazar al agua en la esfera de hidratación de la superficie de proteínas, complejos proteínicos y membranas. Un argumento en contra de estos estudios son los elevados niveles de solutos que son necesarios para alcanzar dicha osmoprotección *in vitro*, y que generalmente no están de acuerdo con los niveles encontrados *in vivo*. Teniendo en cuenta la concentración proteica celular, dicho efecto estabilizador podría alcanzarse a concentraciones menores de solutos, similares a las encontradas *in vivo*. Por ejemplo, la glicilbetaína a concentraciones muy bajas es capaz de proteger tilacoides y membranas frente a la desestabilización por frío o calor (Jolivet *et al.*, 1982; Zhao *et al.*, 1992).

I. 4. C. Respuesta antioxidante.

Las especies reactivas de oxígeno o ROS (por su acepción inglesa *Reactive Oxygen Species*) son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico (O_2) y resultan de la excitación del O_2 para formar el oxígeno singlete (O_2^1), o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar un radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o un radical hidroxilo (OH) respectivamente. En la célula vegetal existen muchas fuentes potenciales de ROS pero principalmente se generan en el cloroplasto y la mitocondria como productos secundarios del metabolismo aeróbico (fotosíntesis y respiración). En condiciones fisiológicas de crecimiento los niveles intracelulares de las ROS son bajos, sin embargo, como consecuencia de

distintos tipos de estrés, entre los que se incluye el estrés salino, la homeostasis celular y el metabolismo aeróbico se desequilibran y en consecuencia la producción de ROS se dispara (Polle *et al.*, 2001). Esta sobreacumulación de ROS originada por el estrés podría suponer una amenaza para la célula pues las especies reactivas de oxígeno son inestables y capaces de oxidar indiscriminadamente componentes celulares como las membranas, proteínas, enzimas o ácidos nucleicos, causando daños irreversibles que podrían incluso llevar a la destrucción oxidativa de la célula (Dat *et al.*, 2000; Hammond-Kosack *et al.*, 1996; Apel y Hirt, 2004).

Los sistemas detoxificadores de ROS en plantas se pueden clasificar en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los sistemas enzimáticos de inactivación de ROS de plantas incluyen principalmente la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT). La SOD actúa en la primera línea de defensa frente a las ROS, catalizando la dismutación del ión superóxido a H_2O_2 , que subsiguientemente las peroxidases APX, GPX o la catalasa reducen a H_2O . En contraste con la CAT, las peroxidases APX y la GPX requieren de la regeneración de sus agentes reductores, ácido ascórbico (AsA) y glutatión reducido (GSH) respectivamente, mediante reacciones energizadas por el agente reductor $NAD(P)H^+$, (Figura 2). A diferencia con la mayoría de organismos, las plantas poseen una multiplicidad de genes que codifican distintas isoformas de la SOD y de la APX localizadas en prácticamente casi todos los compartimentos subcelulares: cloroplastos, mitocondria, peroxisomas, citosol y apoplasto (Asada y Takahashi, 1987). La ubicuidad de estos sistemas detoxificadores podría ser un indicativo de su importancia en el control de los niveles celulares de ROS. La catalasa en cambio, está presente únicamente en los peroxisomas pero ha demostrado ser indispensable para la detoxificación de los elevados niveles de ROS que se producen durante el estrés (Willekens *et al.*, 1997). La extensión del daño oxidativo está determinado por los niveles celulares de superóxido, H_2O_2 e hidroxilo, por lo tanto el balance entre las actividades enzimáticas de la SOD, la APX y la CAT podrían ser claves en el descenso de los niveles tóxicos de ROS provocados por situaciones de estrés. Los sistemas de detoxificación no enzimáticos incluyen los principales tampones red-ox celulares, el ascorbato y el glutatión, así como el tocoferol, los flavonoides, los alcaloides y los carotenoides. En tanto que el GSH se oxida por las ROS a GSSG, el AsA se oxida a monodehidroascorbato (MDA) y dehidroascorbato (DHA) y, en ambos casos, se precisa del poder reductor del $NAD(P)H^+$ para reducir los productos oxidados GSSG y MDA-DHA (ciclo del ascorbato-glutatión) a GSH y AsA mediante las enzimas glutatión reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MDAR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR) respectivamente. Una elevada relación AsA/MDA+DHA y GSH/GSSG es esencial para la inactivación de las ROS en la célula, de hecho los mutantes con niveles reducidos de ácido ascórbico (Conklin *et al.*, 1996) son hipersensibles al estrés abiótico. La importancia de la detoxificación de las ROS en condiciones de estrés salino se pone de manifiesto en estudios con plantas transgénicas de tabaco donde la sobreexpresión de un ADNc que codifica a una proteína con

actividad enzimática dual glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX), implicada en la glutatiónización de sustratos para su compartimentación vacuolar y en la detoxificación del H_2O_2 respectivamente, resultó en una importante mejora de su tolerancia salina (Roxas *et al.*, 1997, 2000). Del mismo modo, la tolerancia a la sal de arroz transgénico se incrementa cuando se sobreexpresa la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) de levaduras, debido probablemente a la reducción del daño oxidativo ocasionado por el radical superóxido (Tanaka *et al.*, 1999).

Aunque tradicionalmente las ROS se han considerado productos tóxicos del metabolismo aeróbico que debían ser eliminadas por los sistemas antioxidantes vegetales, recientemente se descubrió que las plantas producen activamente estas especies como moléculas señalizadoras para controlar procesos como la muerte celular programada, las respuestas al estrés abiótico y la defensa frente a patógenos (Desikan *et al.*, 2001; Knight y Knight, 2001). Así pues, las ROS pueden ser visualizadas como indicadores celulares del estrés y como mensajeros secundarios implicados en la ruta de señalización que desencadena la respuesta frente dicho estrés. Estudios recientes han identificado varios componentes implicados en las rutas de señalización de plantas desencadenada por las ROS, estos incluyen las MAPKKK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) AtANP1 y NtNPK1; las MAPK AtMPK3/6 y Ntp46MAPK (Kovtun *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2000); así como la calmodulina (Desikin *et al.*, 2001; Harding *et al.*, 1997). En un modelo hipotético el H_2O_2 es detectada por un sensor que, como ocurre en la levadura, podría tratarse de una histidina kinasa de dos componentes (Desikin *et al.*, 2001), a continuación se activan la cascada de kinasas MAP y la calmodulina resultando en la activación o supresión de determinados factores de transcripción que posiblemente median en la respuesta de la planta frente al estrés oxidativo (Chinnusamy *et al.*, 2004; Desikin *et al.*, 2001; Maleck *et al.*, 2000). Las plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen *NPK1* demostraron ser más tolerantes a sal, así como a otros estreses abióticos (Kovtun *et al.*, 2000). En este caso la expresión constitutiva de *NPK1* mimetiza la señal generada por el H_2O_2 e inicia una cascada de fosforilación MAP que finalmente induce genes específicos implicados en la respuesta frente al estrés abiótico.

I. 5. Sensores y vías de señalización que regulan la respuesta halotolerante.

Como se ha comentado anteriormente el efecto provocado por la salinidad incluye un componente físico (osmótico) y otro químico (iónico). Tanto el estrés iónico como el osmótico son reconocidos por distintos sensores que activan cascadas de señalización que, a su vez, ejercen un control transcripcional o post-transcripcional sobre los genes que median las respuestas adaptativas y/o patológicas de la planta (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2002; 2003; Shinozaki *et al.*, 2003). Sin embargo, existe una elevada complejidad en el funcionamiento de estas vías de señalización debida al efecto solapante que presentan los distintos tipos de estreses abióticos. Por tanto, se requiere una gran cantidad de elementos y una integración coordinada de las distintas vías de

señalización para activar los procesos necesarios para la obtención de una respuesta adecuada frente a cada tipo de estrés (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2002).

El estrés osmótico puede ser detectado bien a través de canales sensibles a los cambios de turgencia de la membrana celular, bien por kinasas transmembranales, como la histidina kinasa ATHK1 (Urao *et al.*, 1999; 2000), o bien por kinasas asociadas a la pared celular como las WAKs (Kohorn, 2001). No obstante el papel de estos osmosensores en las respuestas adaptativas frente al estrés osmótico está aun por determinar. Por el contrario poco se conoce del mecanismo sensor del exceso de Na^+ en la célula. El sodio en exceso puede ser detectado a nivel extracelular, por receptores de membrana plasmática, o bien a nivel intracelular, por proteínas de membrana o enzima citosólicas sensibles a Na^+ . Se ha postulado que el antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática de *Arabidopsis* AtSOS1 pueda tener un papel dual en el transporte y detección del exceso de Na^+ citosólico (Zhu, 2002), no obstante aún no existen datos experimentales que lo confirmen. En una ruta de señalización genérica, tras la percepción de la señal de estrés abiótico se desencadena la producción de segundos mensajeros como los inositoles fosfato (PIP_2 , IP_3), o especies reactivas de oxígeno (H_2O_2) que a su vez modulan los niveles intracelulares de Ca^{++} iniciando a menudo cascadas de fosforilación de proteínas (MAPKs, CDPKs, CIPKs) que tienen como blanco proteínas directamente implicadas en la adaptación al estrés, o factores de transcripción que modulan la expresión de genes específicos de respuesta al estrés. Los productos de dichos genes a menudo están implicados en el transporte de iones para la detoxificación sódica (*NHX1*, *SOS1*), o bien en la generación de hormonas (ABA, etileno), osmolitos compatibles, o agentes antioxidantes cuyos efectos se coordinan en la adaptación frente al estrés (Hasegawa *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2002; Zhu, 2002). Con objeto de facilitar su estudio las vías de señalización del estrés abiótico en plantas se pueden clasificar en tres grandes grupos (Xiong *et al.*, 2002) (Figura 3):

(I) *Ruta de señalización osmótico/oxidativa.* Hace uso de las cascadas de fosforilación de proteínas catalizadas por las kinasas de tipo MAPK para la producción de osmolitos compatibles y antioxidantes necesarios para la reparación del daño. Además puede estar relacionada con la regulación del ciclo celular.

(II) *Ruta de activación de los genes tipo LEA (Late Embryogenesis Abundant).* Hace uso de las kinasas Ca^{++} -dependientes de tipo CDPKs y está implicada en la activación de genes encargados de la prevención y reparación del daño por deshidratación, como los genes de respuesta al estrés tipo *DRE/CRT* (Zhu, 2001; Xiong y Zhu, 2002).

(III) *Ruta de señalización SOS.* Es dependiente de Ca^{++} y parece regular específicamente la homeostasis iónica originada por el estrés salino. Los efectores de esta ruta de señalización son los transportadores de iones que controlan la homeostasis iónica como es el caso del antiportador Na^+/H^+ SOS1.

Pese a los esfuerzos realizados en el estudio de estas rutas de señalización del estrés abiótico aún hoy poco se sabe acerca de sus intermediarios y funcionamiento. Una excepción es la vía de señalización SOS que, aunque todavía es objeto de profundo análisis, está establecida en términos de proteínas de señalización intermediarias, estímulos y respuesta efectora. Detalles de esta vía de señalización se exponen más extensamente en el apartado I. 8.

I. 5. A. Papel del calcio como mensajero de la salinidad.

En células vegetales tanto el Ca^{++} , como los lípidos, el pH y ciertos nucleótidos cíclicos pueden actuar como segundos mensajeros, pero ninguno de ellos responde a tal variedad de estímulos como el Ca^{++} citosólico (Sanders *et al.*, 1999). Tanto el conjunto de estímulos de tipo abiótico (frío, calor, sequía, salinidad, oxidación) como el ABA, o la giberelina desencadenan respuestas mediadas por un aumento del Ca^{++} citosólico (Sanders *et al.*, 1999). La concentración citosólica de Ca^{++} libre típicamente se mantiene en un rango ≈ 200 nM (Bush, 1995). Cuando por causa de algún estímulo externo este equilibrio se ve alterado se produce un influjo de Ca^{++} al citosol que puede proceder del apoplasto, o bien ser liberado intracelularmente desde orgánulos subcelulares (vacuola, retículo endoplasmático) donde se almacena (Bush, 1995; Sanders *et al.*, 1999; Knight, 2000). Este aumento de la concentración intracelular de Ca^{++} , es transitorio pues enseguida se ponen en marcha mecanismos celulares para reestablecer sus niveles y finalizar así la señal de Ca^{++} . Tres vías contribuyen en el reestablecimiento de la homeostasis celular del Ca^{++} : su unión a proteínas citosólicas, su compartimentación en orgánulos subcelulares (principalmente en la vacuola), y su extrusión al apoplasto (Sanders *et al.*, 1999). En tanto que la entrada de Ca^{++} al citosol se produce de forma pasiva a través de canales de Ca^{++} regulados por voltaje o ligandos (IP_3 , cADPR o Ca^{++}), su extrusión y compartimentación tiene lugar en contra del gradiente electroquímico y por tanto es dependiente de energía. Dos tipos de transportadores contribuyen al tamponamiento de los niveles de Ca^{++} citosólico. Por un lado las ATPasas de calcio tipo P mueven Ca^{++} en contra del gradiente gracias a la hidrólisis directa de ATP y se localizan tanto en el RE (ATPasas tipo IIA) como en la membrana plasmática (ATPasas tipo IIB). Ejemplos de estos transportadores son la OC ATPasa1 de arroz (Chen *et al.*, 1997), o las APTasas AC1, AC2 y AC3 de *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 1997). De otra parte los antiportadores $\text{Ca}^{++}/\text{H}^+$ de la familia de los CAX transportan Ca^{++} utilizando la fuerza motriz generada por la ATPasa de H^+ de la membrana vacuolar.

La implicación del Ca^{++} en un amplio grupo de vías estímulo-respuesta en la célula vegetal plantea diversas cuestiones acerca de cómo distintas respuestas pueden ser reguladas por un mismo mensajero. Son clave a este respecto variables como la amplitud, la duración, la frecuencia de los pulsos y la localización subcelular de la señal de Ca^{++} así como la interacción con distintos efectores celulares del Ca^{++} , que en conjunto definen la “firma” característica de cada señal Ca^{++} en la planta (McAinsh *et al.*, 1997). Existe una gran variedad de proteínas citosólicas que en respuesta

a los aumentos transitorios en la concentración de Ca^{++} , se unen al cation para actuar como efectores celulares de esta señal. En las vías de señalización del estrés abiótico los ligandos de Ca^{++} más significativos son las kinasas calcio-dependientes de la familia de las CDPKs y los sensores de Ca^{++} de la familia de las SCaBP/CBLs. Ambos grupos de efectores son de vital importancia en la traducción de esta señal inorgánica en cascadas de fosforilación específicas que desencadenen la respuesta adecuada a cada estímulo.

La kinasas calcio-dependientes o CDPKs forman una extensa familia de serina/treonina kinasas casi exclusivas de plantas, que se divide en 12 subfamilias que comprenden un total de 34 isoformas en *Arabidopsis* y 27 en arroz (Harper *et al.*, 2004). Su estructura comporta una región carboxiterminal reguladora similar a la calmodulina con cuatro dominios EF-hand para su unión a Ca^{++} . Algunas isoformas tienen un sitio de miristoilación en el extremo aminoterminal lo que sugiere su posible asociación a membranas. A este tipo de kinasas se las denomina “sensores efectores” (*sensor responder*) porque contienen al sensor de Ca^{++} y a su kinasa efectora en una misma proteína. La multiplicidad de isoformas de este grupo de kinasas, sumado a sus distintas afinidades por diferentes sustratos (Lee *et al.*, 1998) y a su desigual umbral de activación por Ca^{++} sugiere la posibilidad de que cada CDPK descifre una señal de Ca^{++} determinada e interactúe con efectores específicos para generar una infinidad de respuestas diferentes que controlan no sólo el estrés abiótico sino también diversos aspectos del crecimiento y desarrollo, el metabolismo y otras funciones fisiológicas vitales para la planta (Harper *et al.*, 2004).

Tanto en *Arabidopsis* como en arroz la familia de sensores de Ca^{++} de tipo CBL (del inglés *calmodulin-B like*) está representada por 10 isoformas (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Su secuencia aminoacídica comporta cuatro dominios EF-hand de unión a Ca^{++} y está relacionada con la subunidad reguladora de la calcineurina de levadura (CNB) y con sensores de Ca^{++} neuronales (NCS) (Liu y Zhu, 1998). Puesto que carecen de actividad enzimática *per se*, para transmitir la señal de calcio requieren de la interacción con otras proteínas efectoras. En contraste con la calmodulina, que interacciona con un grupo diverso de efectores como kinasas, transportadores de iones, y factores de transcripción (Yang y Poovaiah, 2003), los sensores CBLs interaccionan específicamente con un grupo definido de proteínas kinasas denominadas CIPKs (del inglés *CBL interacting protein kinases*) (Shi *et al.*, 1999; Halfter *et al.*, 2000). Se trata de una familia de kinasas de serina/treonina específica de plantas que cuenta con 25 miembros en *Arabidopsis* y 30 en arroz (Albrecht *et al.*, 2001; Kolukisaoglu *et al.*, 2004). A este respecto este sistema efector es fundamentalmente diferente a las CDPKs, porque el conjunto CBL/CIPK combina 10 sensores y 25 kinasas interaccionantes que multiplican las posibilidades de respuestas frente a las distintas señales de calcio. Detalles de este sistema efector y sus componentes se analizan en mayor extensión en el apartado I.9.

I. 5. B. Expresión génica de respuesta al estrés abiótico.

La expresión de numerosos genes se ve alterada en la planta por factores ambientales de tipo abiótico como la sequía, la salinidad o el frío (Thomashow, 1999; Bray *et al.*, 2000; Shinozaki *et al.*, 2003). El análisis del transcriptoma mediante técnicas de “microchips” es una herramienta muy poderosa que ha permitido la identificación de un extenso grupo de genes de respuesta al estrés abiótico (Shinozaki *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2004). Para facilitar su estudio, estos genes se pueden agrupar de acuerdo a su función en la respuesta adaptativa frente al estrés. En el caso del estrés salino, muchos de los genes inducidos codifican proteínas directamente implicadas en la homeostasis iónica. Claros ejemplos de estos efectores son el antiportador Na^+/H^+ SOS1 de membrana plasmática encargado de la extrusión del Na^+ (Shi *et al.*, 2000), el antiportador Na^+/H^+ vacuolar (Apse *et al.*, 1999) responsable de la compartimentación del Na^+ , o transportadores de K^+ de alta afinidad necesarios para la nutrición mineral. Otro grupo de genes que se inducen por el estrés salino y/u osmótico son los genes implicados en la homeostasis osmótica como las acuoporinas y las enzimas encargadas de la síntesis de osmolitos compatibles (Bray, 1993; Shinozaki *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1996; Zhu, 2001). No obstante la mayoría de los genes inducidos por el estrés salino codifican proteínas implicadas en la prevención y reparación del daño como por ejemplo las proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*), enzimas detoxificadoras (SOD), chaperonas, proteasas, o enzimas implicadas en la ubiquitinación. Análisis moleculares y genómicos indican que existen diferentes mecanismos de regulación transcripcional involucrados en la expresión de los genes de respuesta al estrés. Para el estudio de estos mecanismos de regulación los genes se pueden clasificar en “genes de respuesta temprana” y “genes de respuesta tardía”. Los primeros son genes de inducción rápida y a menudo transitoria que no requiere la síntesis de proteínas. Típicamente codifican factores de transcripción que a su vez modulan a otros genes de respuesta temprana. En cambio los genes de respuesta tardía constituyen la gran mayoría de los genes de respuesta al estrés y, aunque su activación es más lenta, su expresión generalmente es sostenida. Dos importantes elementos *cis*-reguladores han sido identificados por su implicación en el control transcripcional de genes respuesta tardía al estrés abiótico: el elemento ABRE y el DRE/CRT (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Se localizan en la región promotora del gen e interaccionan con determinados factores de transcripción para formar un complejo activador de la ARN polimerasa que actúa como un interruptor molecular de la expresión génica en respuesta al estrés. El elemento ABRE (*ABA responsive element*) es un importante regulador de la expresión génica dependiente de ABA e interacciona con factores de transcripción tipo bZIP (*basic domain leucine zipper*) denominados AREB o ABFs (Guiltinan *et al.*, 1990; Uno *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2000). El elemento DRE/CRT en cambio es esencial en la regulación ABA-independiente de la expresión de genes de respuesta al estrés (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994) e interacciona con factores reguladores *trans* como CBF1 (Stockinger *et al.*, 1997), DREB1A o DREB2A (Liu *et al.*, 1998). Estos elementos *cis*-reguladores no siempre actúan de manera independiente pues en

promotores como el gen *RD29A* coexisten elementos DRE y ABRE lo que evidencia la existencia de un intercambio de señales entre ambas vías de regulación transcripcional dependiente e independiente de ABA (Narusaka *et al.*, 2003).

I. 5. C. Papel del ABA en el estrés salino.

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona ubicua en todo el reino vegetal producida también por algunos tipos de hongos fitopatógenos (Assante *et al.*, 1977; Neill *et al.*, 1982; Kitagawa *et al.*, 1995). El ABA es un potente inhibidor del crecimiento que desempeña funciones fundamentales en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos tan diversos como el letargo de la semilla, la abscisión de hojas y frutos, y la adaptación frente a estreses ambientales de tipo abiótico (Zeevart y Creelman, 1988; Leung y Giraudat, 1998). Es por tanto un antagonista de fitohormonas del crecimiento como las auxinas, la giberelina y las citocininas. Una gran variedad de mutantes con una respuesta alterada frente a ABA se han identificado mediante cribados genéticos de plantas de *Arabidopsis*. Estos mutantes son extremadamente útiles en la caracterización funcional de la hormona y en la identificación de los distintos genes involucrados en las cascadas de señalización ABA-dependientes. Se pueden clasificar en tres categorías: mutantes en la biosíntesis de ABA (*aba1*, *aba2*, *aba3*), mutantes que exhiben insensibilidad a ABA (*abi3*, *abi4*, *abi5*) y mutantes hipersensibles frente ABA (*era1*, *sad1*, *abh1*).

Los niveles de ABA en cualquier tejido vegetal vienen determinados por el balance entre su biosíntesis y su catabolismo (Nambara y Marion-Poll, 2005). En respuesta al estrés hídrico se produce una acumulación de ABA como resultado de una activación de su ruta biosintética y posiblemente de una inhibición de sus vías de degradación (Zhu, 2002). A pesar del amplio conocimiento sobre el control de las rutas metabólicas de síntesis y degradación de ABA, la información sobre las cascadas de señalización existentes entre la percepción del estrés osmótico y la inducción de los genes de biosíntesis y catabolismo de ABA, es muy limitada. Se ha postulado que la percepción del estrés osmótico y la señalización del ABA pueden estar conectados a través de vías dependientes de kinasas (Zhu, 2002). Esto parece ser apoyado por el aislamiento y caracterización de un gen de *Arabidopsis* que presenta similitud con el osmosensor de levadura SLN1 y que codifica una histidín-kinasa (AtHK1) y que en *Arabidopsis* responde a ABA, frío y salinidad (Urao *et al.*, 1999). Podemos distinguir dos funciones desempeñadas por el ABA en respuesta al estrés osmótico y/o salino: el control del balance hídrico global de la planta y el desarrollo de la tolerancia celular frente a la deshidratación. Mientras que la función de control del balance hídrico se lleva a cabo fundamentalmente a través de la regulación de las células oclusivas de los estomas, la tolerancia celular es un proceso que implica la inducción de genes que codifican proteínas de tolerancia frente a la deshidratación en prácticamente todos los tejidos vegetales (Llorente *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2001). Aunque ambos fenómenos proceden de cascadas de señalización independientes tienen en común su fase inicial, en la cual la elevación de los niveles

de ABA endógeno bajo condiciones de estrés osmótico y/o salino actúa como mediador esencial en la activación de la respuesta osmotolerante de la planta (Skriver y Mundy, 1990; Chandler y Robertson, 1994; Bray, 1997; Leung y Giraudat, 1998; Zhu 2002). No obstante en la respuesta global de la planta frente al estrés hídrico hay que distinguir además un componente independiente de ABA. Estudios de regulación génica de los mutantes ABA-deficientes (*aba*) y ABA-insensibles (*abi*) han demostrado que algunos genes de respuesta al estrés osmótico se inducen de manera independiente de ABA, mientras que otros se inducen de manera completa o parcialmente dependiente de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). La identificación de los elementos *cis* reguladores ABRE (ABA-dependiente) y DRE/CRT (ABA-independiente) y de sus factores de unión ha sido de gran ayuda en la comprensión de los mecanismos de regulación hormonal de la expresión de genes de respuesta al estrés (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005).

I. 6. Manipulación genética para la obtención de plantas halotolerantes.

Numerosas publicaciones exponen diversas vías para la mejora de la tolerancia salina de la planta mediante técnicas de ingeniería genética y, aunque se han conseguido importantes logros a este respecto, la gran complejidad genética de los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico dificulta sobremanera esta tarea. Así pues, para la búsqueda de los genes claves cuya manipulación pueda actuar como un interruptor biotecnológico de la tolerancia al estrés es preciso un mejor entendimiento de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y genéticos implicados a nivel molecular en la adaptación y el crecimiento en condiciones de estrés. Los genes hasta ahora empleados en la mejora genética de la halotolerancia han sido aislados de todo tipo de organismos (bacterias, levaduras, halofitas y glicofitas) y expresados en diversas especies vegetales, tanto plantas modelo (*Arabidopsis*), como especies de interés agronómico (tomate, arroz, tabaco etc.). Es posible clasificar dichos genes en cuatro grupos de acuerdo con las vías metabólicas y mecanismos modificados para la mejora de la tolerancia salina (Borsani *et al.*, 2003).

a) Síntesis de osmolitos

En respuesta al estrés osmótico y salino la planta acumula osmolitos compatibles como la prolina o la glicil-betaína con el objetivo de mantener la turgencia celular (Hasegawa *et al.*, 2000). La sobreacumulación de prolina en plantas transgénicas obtenida mediante la sobreexpresión de sus enzimas biosintéticas (pirrolina-5-carboxilato sintasa) o el silenciamiento de sus enzimas degradativas (prolina deshidrogenasa) resulta en una importante mejora de la halotolerancia (Kishor *et al.*, 1995; Mani *et al.*, 2002; Nanjo *et al.*, 1999). De igual manera la expresión en plantas de enzimas bacterianas o procedentes de halofitas implicadas en la biosíntesis de la glicil-betaína ha demostrado mejorar la respuesta de la planta frente al estrés salino (Lilius *et al.*, 1996;

Li *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2000) y otros tipos de estrés abiótico (Hayashi *et al.*, 1997; Alia *et al.*, 1998; Sakamoto *et al.*, 2000).

b) Estrés oxidativo e integridad celular

La salinidad provoca un aumento en la producción de ROS y su efecto oxidativo puede resultar nocivo para el metabolismo celular (Polle, 1997; Borsani *et al.*, 2001b). La mayoría de las estrategias de mejora de la halotolerancia de plantas se basan en la sobreexpresión de genes relacionados con la detoxificación de las ROS y con la protección frente al daño celular. La sobreexpresión de enzimas reductoras como la SOD, la ascorbato peroxidasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa resulta en un aumento de la tolerancia de la planta transgénica frente al estrés salino y oxidativo (Tanaka *et al.*, 1999; Roxas *et al.*, 1997, 2000; Allen *et al.*, 1997). El gen de cebada (*Hordeum vulgare*) *HvA1* pertenece al grupo de genes de tipo LEA y se induce por ABA y varios tipos de estrés abiótico, incluyendo la salinidad (Hong *et al.*, 1992). Plantas de arroz transgénico que expresan *HvA1* de manera constitutiva muestran una mejora significativa en la tolerancia salina e hídrica (Xu *et al.*, 1996; Chandra *et al.*, 2004), hecho que se ha explicado mediante la protección de membranas celulares.

c) Homeostasis iónica

Una estrategia lógica aunque menos utilizada para la mejora genética de la halotolerancia es la manipulación de genes que modulen el transporte iónico para ayudar así en el reestablecimiento de la homeostasis iónica de la planta. *HAL1* y la calcineurina son reguladores de la homeostasis intracelular de K^+ y Na^+ en *S. cerevisiae* (Nakamura *et al.*, 1993; Gaxiola *et al.*, 1992; Mendoza *et al.*, 1994, 1996). La expresión ectópica de estas proteínas reguladoras de levadura mejora la tolerancia salina de plantas transgénicas de tomate y tabaco respectivamente (Pardo *et al.*, 1998; Gisbert *et al.*, 2000). Adicionalmente la sobreexpresión de transportadores vacuolares implicados en la compartimentación del Na^+ citosólico, como son el antiportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis* *AtNHX1* o la H^+ -pirofosfatasa *AVP1*, ha demostrado mejorar la respuesta de plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Apse *et al.*, 1999; Blumwald 2003; Gaxiola *et al.*, 2001) y tomate (Zhang *et al.*, 2001) frente al estrés salino. Por otro lado plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática de *Arabidopsis* *AtSOS1*, encargado de la expulsión activa de Na^+ del citosol, demuestran una importante mejora en su tolerancia salina (Shi *et al.*, 2003).

d) Factores de transcripción

Los factores reguladores *trans* de tipo CBF/DREB interaccionan con el elemento DRE/CRT localizado en los promotores de ciertos genes de respuesta al estrés abiótico. La sobreexpresión en plantas de este tipo de factores de transcripción promueve la expresión de

dichos genes y consecuentemente mejora la respuesta de las plantas transgénicas frente al estrés salino, el frío y la sequía (Liu *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999).

I. 7. Clasificación de los antiportadores Cation/H⁺.

La nutrición mineral de la planta se sustenta en la actividad de los transportadores de membrana, encargados de absorber los iones desde el sustrato y de su distribución intra- e intercelular en la planta. El genoma de *Arabidopsis* ha revelado la existencia de más de 800 proteínas transportadoras de membrana, de las cuales el 65% son transportadores activos secundarios. Estos co-transportadores se pueden clasificar en base a su filogenia o a su función como transportadores de cationes, aniones o compuestos orgánicos (azúcares o aminoácidos) (Saier, 2000). En plantas, la mayoría de los co-transportadores adquieren su energía del gradiente electroquímico de protones generado por las H⁺-ATPasas distribuidas por todas las membranas celulares. Esta extensa variedad de transportadores de membrana podría proveer a la planta de estrategias flexibles para hacer frente a las fluctuaciones del medio y para minimizar los efectos adversos de la deficiencia de nutrientes y del exceso de iones tóxicos.

Estudios filogenéticos computerizados del genoma completo de *Arabidopsis* han revelado la existencia de una amplia familia de antiportadores cation/H⁺ que, para facilitar su estudio, se divide en cuatro subfamilias filogenéticas: CaCA, NhaD, CPA1 y CPA2 (Mäser *et al.*, 2001). En base al gradiente electroquímico relativo de sus sustratos, cationes (principalmente Na⁺, K⁺ y Ca⁺⁺) y protones, la mayoría de estos intercambiadores estarían implicados en la extrusión de cationes desde el citosol al medio externo a través de la membrana plasmática, o a compartimentos intracelulares como la vacuola.

a) Subfamilia CaCA: Está formada por 11 isoformas de intercambiadores Ca⁺⁺/H⁺ denominados CAX1 a 11. Las isoformas CAX1 y CAX2 son capaces de suprimir la deficiencia en el transporte vacuolar del Ca⁺⁺ en mutantes *vcx1* de levadura. Evidencias crecientes implican a las isoformas CAX1-4 en el secuestro del Ca⁺⁺ y otros metales (Mn⁺⁺, Cd⁺⁺) en la vacuola y localizan en el extremo aminoterminal un dominio modulador de la capacidad intercambiadora (Shigaki *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Pittman *et al.*, 2002). AtMHX es una proteína relacionada filogenéticamente con la familia de transportadores CAX y está implicada en el transporte acoplado a H⁺ de Mg⁺⁺ y Zn⁺⁺ a la vacuola vegetal (Shaul *et al.*, 1999).

b) Subfamilia NhaD: Se compone únicamente de dos miembros (*NHD1* y *NHD2*) aún sin caracterizar que, no obstante, guardan una cierta similitud con los antiportadores Na⁺/H⁺ encontrados en bacterias.

c) Subfamilia CPA1: Incluye ocho proteínas, entre ellas las bien caracterizadas AtNHX1 y SOS1, que catalizan el intercambio Na⁺/H⁺ en el tonoplasto y la membrana plasmática respectivamente (Blumwald 2000; Qiu *et al.*, 2002). Sus miembros se pueden agrupar en dos clados diferenciados: el subgrupo de antiportadores NHE/NHX que incluye cinco isoformas

(NHX1 a 6); y el subgrupo de antiportadores SOS/NhaP con solo dos miembros (SOS1 y At1g14660).

d) Subfamilia CPA2: Se trata probablemente de la subfamilia de antiportadores catión/H⁺ más extensa en plantas con 33 miembros que incluyen 28 intercambiadores catión/H⁺ CHX y 5 homólogos del antiportador K⁺/H⁺ AtKEA1. Los miembros de esta familia de transportadores están siendo actualmente caracterizados y poco se conoce aún acerca de sus funciones y localización.

El intercambiador de *Arabidopsis* AtNHX1 fue el primer antiportador Na⁺/H⁺ identificado en plantas (Gaxiola *et al.*, 1999). Desde entonces el número de homólogos NHX encontrados ha crecido enormemente. Con la sola excepción de la levadura, donde sólo existe un único gen *NHX1*, los intercambiadores NHE/NHX se presentan en múltiples isoformas en todos los genomas secuenciados hasta hoy. Los intercambiadores NHX de plantas son proteínas de aproximadamente 550 residuos que exhiben la topología típica de los transportadores con 10-12 dominios transmembrana y una cola carboxiterminal hidrofílica situada presumiblemente en el lado citosólico. La extensión aminoterminal, responsable de la formación del poro, es la más conservada entre las distintas isoformas NHXs, mientras que el dominio carboxiterminal presenta una mayor semejanza de secuencias, hecho que posiblemente refleja las diferencias en la regulación de cada isoforma (Putney *et al.*, 2002). En base a su homología de secuencias proteínicas, la subfamilia de intercambiadores NHE/NHX se puede clasificar en dos grandes grupos que, de acuerdo a su localización subcelular, se han denominado MP (membrana plasmática) e IC (intra-celular) (Brett *et al.*, 2005). El grupo de intercambiadores MP es exclusivo de células de animales, mientras que los miembros del grupo IC se pueden encontrar tanto en animales, como en plantas y hongos (Brett *et al.*, 2005). Todos los NHXs de plantas caracterizados hasta hoy pertenecen al grupo IC y se pueden clasificar a su vez en transportadores de clase I y de clase II. En *Arabidopsis*, las isoformas de la clase I (AtNHX1 a 4) presentan una similitud de secuencias con AtNHX5 y 6 (clase II) de sólo un 21-23% (Yokoi *et al.*, 2002). Además, en tanto que los NHXs de clase I se localizan en la membrana vacuolar y son exclusivos de plantas, las isoformas de clase II se localizan en vesículas endosomáticas y se han encontrado homólogos en plantas, animales y hongos (Pardo *et al.*, 2006). Otra característica distintiva de cada clase parece ser su selectividad por el substrato iónico. Los intercambiadores vacuolares de clase I catalizan el intercambio Na⁺/H⁺ o K⁺/H⁺ con similar afinidad (Venema *et al.*, 2002; Apse *et al.*, 2003), mientras que los intercambiadores endosomáticos de clase II muestran preferencia por el K⁺ sobre el Na⁺ como substrato (Venema *et al.*, 2003). Este conjunto de características diferenciales entre los antiportadores NHXs de clase I y II son un indicio de su posible implicación en funciones diferenciales *in planta* (Pardo *et al.*, 2006).

I. 8. Sistema SOS de regulación de la homeostasis iónica.

I. 8. A. Estudio filogenético y funcional del antiportador SOS1.

Según la clasificación filogenética de Saier (2000), SOS1 pertenece a la subfamilia NhaP de antiportadores Na^+/H^+ , un subgrupo incluido en la familia de antiportadores de cationes CPA1, presentes en todos los grupos taxonómicos de eucariotas. En una clasificación filogenética anterior SOS1 se denominó NHX7 y se incluyó en la subfamilia NHX/NHE de antiportadores Na^+/H^+ (Mäser *et al.*, 2001), hecho que se explica por las similitudes que presentan ambos tipos de antiportadores. No obstante, cuando el mismo estudio filogenético se llevó a cabo con un número mayor de proteínas NhaP de varios organismos su sensibilidad aumentó y pudieron distinguirse dos clados claramente diferenciados (Brett *et al.*, 2005). Por esta razón y para evitar confusiones, se sugirió que el nombre NHX7 se suprimiera a favor del nombre original SOS1 (Pardo *et al.*, 2006).

La subfamilia NhaP de antiportadores catión/protón se encuentra representada en bacterias, protozoos y plantas, pero no en animales (Brett *et al.*, 2005). La estructura que se predice para este grupo de intercambiadores consiste en una región aminoterminal transmembrana seguida de una extensión hidrofílica carboxiterminal que, en el caso de los homólogos NhaP eucarióticos, es extremadamente larga, con más de 600 residuos. Puesto que la región carboxiterminal de muchos otros transportadores ha demostrado albergar una función regulatoria (Putney *et al.*, 2002), en el caso de los intercambiadores NhaP eucarióticos sería lógico esperar un tipo de regulación bastante compleja. Con la sola excepción del transportador SOS1 de *Arabidopsis*, la localización subcelular y la caracterización bioquímica del resto de los antiportadores NhaP eucarióticos no se encuentra por el momento disponible. A diferencia con los transportadores NHX, localizados principalmente en membranas intracelulares (Pardo *et al.*, 2006), SOS1 se localiza en la membrana plasmática (Shi *et al.*, 2002). Además se trata de un transportador altamente específico hacia el Na^+ y parece incapaz de transportar otros cationes monovalentes como el K^+ o el Li^+ (Shi *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002). En un principio la sola existencia de intercambiadores Na^+/H^+ en la membrana plasmática fue cuestionada pues sólo un número limitado de especies vegetales apoyaban con datos bioquímicos la presencia de actividad antiportadora $\text{Na}^+ (\text{K}^+)/\text{H}^+$ en la membrana plasmática (Mennen *et al.*, 1990). La clonación del gen *SOS1* de *Arabidopsis* así como la presencia de más de 120 ESTs que codificaban proteínas similares a SOS1 en 31 especies diferentes demostraron no sólo la existencia de esta familia de transportadores sino también su amplia distribución en plantas. El número de miembros de la familia de genes *NhaP* en cada especie vegetal individual está aún por definir pues son pocas las secuencias genómicas completas disponibles en la actualidad. Genes homólogos a *SOS1* han sido descritos solamente en *Physcomitrella patens* y en *Cymodocea nodosa* (Benito y Rodríguez-Navarro, 2003). En las secuencias genómicas completas de arroz y *Arabidopsis* se han encontrado

uno (*Os12g44360*) y dos (*SOS1* y *At1g14660*) genes similares a *SOS1* respectivamente. La proteína codificada por el locus *At1g14660* es muy similar a *SOS1* (72% de identidad) con un extremo carboxiterminal aproximadamente 400 residuos más corto que *SOS1*, y cuya función está aún por determinar. El claro fenotipo de halosensibilidad de las plantas mutantes *sos1* sugiere que probablemente la proteína codificada por el locus *At1g14660*, a pesar de su elevada identidad de secuencia, pueda tener una función no solapante con *SOS1*. En cambio, como se demuestra en este trabajo, el homólogo de *SOS1* de arroz se comporta como un equivalente funcional de *AtSOS1* pues exhibe actividad antiportadora Na^+/H^+ y suprime parcialmente el fenotipo del mutante *sos1* de *Arabidopsis*.

En base al patrón de expresión de *SOS1* y a las características fisiológicas de las plantas mutantes *sos1*, se ha propuesto que *SOS1* podría estar implicado en el control del transporte a larga distancia de Na^+ en *Arabidopsis* (Shi *et al.*, 2002). El patrón de expresión de *SOS1* se ha analizado mediante una fusión del promotor de *SOS1* al gen reportero *GUS*, detectándose su actividad principalmente en los tejidos internos que rodean a la vasculatura de la planta completa. En la raíz, la actividad *GUS* se detectó principalmente en el periciclo y en las células parenquimáticas que bordean los vasos del xilema. La disección del tallo y el peciolo reveló la actividad *GUS* restringida a las células parenquimáticas del límite xilema/simplasto. Adicionalmente la expresión de *SOS1* también se detectó en las células epidérmicas del ápice de la raíz. Puesto que este tipo de células epidérmicas están indiferenciadas y carecen de vacuolas lo suficientemente desarrolladas para compartimentar el exceso Na^+ , la extrusión activa del Na^+ citoplasmático ejercida por *SOS1* podría jugar un papel crítico en la prevención de la acumulación de Na^+ en el ápice de la raíz. Por otra parte la expresión preferencial de *SOS1* en las células parenquimáticas que rodean al xilema reafirma el papel de este antiportador en el transporte de Na^+ a larga distancia en la planta. En respuesta a un exceso de sal (100 mM NaCl), el mutante *sos1* de *Arabidopsis* acumula más Na^+ que la planta silvestre; en cambio cuando el estrés salino es moderado (25 mM NaCl), la acumulación sódica del mutante *sos1* es considerablemente inferior a la encontrada en el silvestre (Ding y Zhu, 1997; Shi *et al.*, 2002). Como se ha discutido anteriormente (Apartado I.4.A.1), cuando la salinidad es moderada, *SOS1* actuaría cargando Na^+ en el xilema para su distribución controlada a la parte aérea y su almacenamiento vacuolar en las células del mesófilo de la hoja. Cuando el estrés salino es severo, *SOS1* actuaría descargando Na^+ al xilema de la hoja evitando así que una acumulación rápida del ión en las células del mesófilo foliar pudiera saturar la capacidad de compartimentación sódica vacuolar y ocasionar daños celulares irreversibles (Figura 5).

I. 8. B. Regulación del sistema SOS.

El progreso alcanzado hasta hoy en el entendimiento de los mecanismos de regulación del sistema SOS es bastante significativo. La actividad antiportadora Na^+/H^+ ejercida por *SOS1* se ha

detectado en vesículas de membrana plasmática aisladas de plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino. En cambio, es indetectable en las plantas control no estresadas (Qiu *et al.*, 2002). La potenciación de la actividad antiportadora de SOS1 se desarrolla a dos niveles al menos: estabilidad del mensajero y activación directa de su función intercambiadora de iones. Intermediarios claves en la regulación de SOS1 son la proteína quinasa SOS2/CIPK24 y el sensor de calcio SOS3/CBL4. Plantas de *Arabidopsis* mutantes *sos2* y *sos3* comparten el mismo fenotipo de halosensibilidad y deficiencia de K⁺ que presenta el mutante *sos1* (Zhu, 2000) lo que reafirma su papel en la misma ruta de regulación del antiportador SOS1. El gen *SOS3/CBL4* codifica a una proteína que une Ca⁺⁺ (tipo EF-hand) similar a CNB de levadura y que es capaz de detectar los cambios transitorios en los niveles intracelulares del ión provocados por el estrés salino. SOS2 es una proteína-quinasa de serina y treonina con un dominio aminoterminal catalítico similar a la proteína de levadura SNF1 y a las kinasas dependientes de AMPc de animales (Liu *et al.*, 2000). La región carboxiterminal de SOS2 es única en plantas y alberga un dominio autoinhibitorio (dominio FISL) que interacciona físicamente con SOS3. La unión de SOS3 al dominio FISL de SOS2 en respuesta a una señal de calcio suprime la autoinhibición de la quinasa y dirige al complejo SOS2/SOS3 activado a la membrana plasmática, donde va a fosforilar al antiportador Na⁺/H⁺ SOS1, promoviendo así la expulsión activa de sodio del citosol (Guo *et al.*, 2001; Quintero *et al.*, 2002) (Figura 4). La delección del dominio autoinhibitorio FISL resulta en una quinasa SOS2 constitutivamente activa e independiente de SOS3 (SOS2 Δ 308; Guo *et al.*, 2004). La estructura cristalina de SOS3 ha sido publicada recientemente (Sánchez-Barrena *et al.*, 2005). Sánchez-Barrena *et al.* (2005) exponen que, tras la unión a Ca⁺⁺, SOS3 experimenta un proceso de dimerización en el que quedan expuestos sus dominios hidrofóbicos. Este cambio en las propiedades superficiales de SOS3 podría facilitar su interacción con SOS2 y la subsiguiente transmisión de la señal de calcio evocada por el estrés.

La activación bioquímica del intercambio Na⁺/H⁺ de SOS1 está controlada por la fosforilación del antiportador por el complejo quinasa SOS2/SOS3. La co-expresión de los tres genes *SOS* en una cepa de levadura que carece de los transportadores de Na⁺ endógenos suprime su fenotipo de halosensibilidad hasta un nivel muy superior al alcanzado por SOS1 solo, en tanto que SOS2 activa a SOS1 sólo parcialmente y SOS3 es incapaz de estimular la actividad de SOS1 por sí misma (Quintero *et al.*, 2002). Adicionalmente el complejo quinasa SOS2/SOS3 promueve la fosforilación de SOS1 en fracciones de membrana plasmática de levadura, y la quinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308 aislada de bacterias es capaz de fosforilar *in vitro* al antiportador SOS1 purificado. Ambos resultados apuntan a SOS1 como sustrato genuino de la quinasa SOS2. De conformidad con estos datos, la actividad de SOS1 no se potencia por el estrés salino en las plantas mutantes *sos2* y *sos3* (Qiu *et al.*, 2002), pero la adición de la quinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308 a vesículas de membrana plasmática aisladas de mutantes *sos2* y *sos3* restaura la actividad antiportadora de

SOS1, cosa que no sucede cuando las vesículas proceden del mutante *sos1*. Aparte de activar a la kinasa SOS2, SOS3 ha demostrado ser el responsable de su reclutamiento a la membrana plasmática para facilitar una fosforilación efectiva del antiportador SOS1 (Quintero *et al.*, 2002). La N-miristoilación de SOS3 es imprescindible para su funcionalidad *in planta* (Ishitani *et al.*, 2000) y para el posicionamiento del complejo SOS2/SOS3 en la membrana plasmática (Pardo *et al.*, 2005). Pese a todo, la evaluación *in planta* de una serie de alelos mutantes de SOS2 ha revelado que la kinasa podría alcanzar la membrana plasmática en ausencia de SOS3, posiblemente como resultado de su interacción con otras proteínas alternativas de tipo S_{Ca}BP o incluso ABI2 (Guo *et al.*, 2004). Proteínas mutantes de SOS1 truncadas en el extremo carboxiterminal devienen hiperactivos e independientes del complejo SOS2/SOS3 (Pardo *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que el dominio carboxiterminal de SOS1, en condiciones basales, podría ejercer un efecto autoinhibitorio sobre la actividad transportadora y que su fosforilación por SOS2 suprimiría dicho efecto autoinhibitorio.

Los niveles del transcrito de SOS1 se elevan por el estrés salino por razón de un mecanismo que es parcialmente dependiente de SOS2 y SOS3 (Shi *et al.*, 2000). Además la regulación de la abundancia del mensajero parece ser post-transcripcional pues sus niveles aparecen regulados incluso cuando la transcripción de *SOS1* esta dirigida por el promotor constitutivo *CaMV35S* (Shi *et al.*, 2003). Aunque nada se conoce aún de los factores que modulan la estabilidad del mensajero de *SOS1*, los bajos niveles del transcrito acumulado en líneas transgénicas bajo condiciones de crecimiento estándar sugieren que éste puede ser inestable en ausencia de sal y que el estrés salino ocasione una estabilización post-transcripcional del mensajero.

I. 8. C. Interacción de la ruta SOS con la nutrición de K⁺.

Los mutantes de *Arabidopsis* que carecen del transportador SOS1 o de alguno de sus proteínas moduladoras (SOS2 o SOS3), manifiestan los síntomas de una deficiencia de K⁺ cuando crecen en medios pobres en K⁺ (K⁺ <200 µM), hecho que sugiere que la ruta Ca⁺⁺-dependiente SOS podría tener un efecto regulatorio positivo sobre la absorción de dicho nutriente. SOS1 es el único sustrato conocido del complejo kinasa SOS2/SOS3 y su actividad antiportadora Na⁺/H⁺ ha sido demostrada, así como su incapacidad para transportar K⁺ tanto condiciones basales como tras su activación por la kinasa SOS2/SOS3 (Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002). Niveles elevados de Na⁺ en la solución del sustrato se consideran perjudiciales para la nutrición del K⁺ debido a que compiten por los sitios de unión en los sistemas de transporte que median la absorción del K⁺ (Hasegawa *et al.*, 2000). No obstante, el fenotipo de deficiencia de potasio de los mutantes *sos* resulta desconcertante y plantea la cuestión de cómo una alteración en la homeostasis

de Na^+ afecta a la nutrición de K^+ más allá de la competición por sistemas transportadores comunes.

El fenotipo de deficiencia de potasio de los mutantes *sos* esta condicionado por la presencia de Ca^{++} , pues se exagera con niveles bajos del ión (0.15 mM) y se suprime cuando sus niveles son elevados (3 mM). Es bien conocido que el calcio mejora la selectividad K^+/Na^+ en la absorción de iones reduciendo de manera efectiva la toma de Na^+ y mejorando con ello la tolerancia salina de la planta. Datos electrofisiológicos sugieren que los canales no selectivos de cationes (NSCCs) de la membrana plasmática son los responsables de, al menos, parte de la absorción de Na^+ que está mediada por transportadores. Los NSCCs se caracterizan por su escasa selectividad con respecto a los cationes inorgánicos monovalentes, además en tanto que algunos NSCCs son también permeables a cationes divalentes como el Ca^{++} o el Mg^{++} , otros muchos se inhiben por el Ca^{++} (revisado por Demidchik *et al.*, 2002). El genoma de *Arabidopsis* ha revelado la existencia de dos grandes familias de NSCCs que conservan una cierta similitud de secuencias con sus equivalentes en animales, más concretamente con los canales regulados por nucleótidos cíclicos y calmodulina (CNGCs) y con los canales similares al receptor del glutamato (GLRs). Mediante estudios de transporte en protoplastos de membrana plasmática de raíces de *Arabidopsis*, Maathuis y Sanders (2001) han demostrado la presencia de actividad de canales CNGCs que, inversamente a lo que sucede con los CNGCs de animales, se inhiben por cAMP y cGMP (Demidchik *et al.*, 2002; Talke *et al.*, 2003). Adicionalmente, cuando el medio de crecimiento se suplementa con nucleótidos cíclicos (cAMP o cGMP), la absorción de Na^+ se reduce y la tolerancia salina de la planta mejora considerablemente (Maathuis y Sanders, 2001). A nivel molecular, el canal de *Arabidopsis* AtCNGC1, que se expresa en la raíz vegetal y transporta Na^+ al igual que K^+ , podría ser parcialmente responsable de la absorción de Na^+ que es inhibible por Ca^{++} (Leng *et al.*, 2002; Hua *et al.*, 2003). Así pues, la inhibición de los canales NSCC (AtCNGC1 y otros) por el ión Ca^{++} posiblemente reduce la absorción neta de Na^+ de los mutantes *sos* aliviando por consiguiente su fenotipo de deficiencia de K^+ cuando crecen en medios pobres en dicho nutriente.

La mutación *htk1*, aislada inicialmente como supresor extragénico de la halosensibilidad del mutante *sos3*, suprime igualmente el fenotipo de deficiencia de K^+ de los mutantes *sos*. En cambio, la sobreexpresión moderada de AtHKT1 exagera dicha deficiencia en plantas silvestres y mutantes *sos3* (Rus *et al.*, 2001, 2004). Ensayos de expresión heteróloga en levaduras y oocitos de *Xenopus* han demostrado que los transportadores HKT de plantas son todos permeables a Na^+ y en algunos casos también a K^+ . El transportador de trigo *TaHKT1* se comporta como un simportador Na^+/K^+ de alta afinidad en medios con bajo K^+ o Na^+ , sin embargo, en presencia suficientes cantidades de ambos iones, el transporte de K^+ se inhibe tornándose en un transportador de Na^+ de baja afinidad (Rubio *et al.*, 1995; Gassman *et al.*, 1996). En arroz, las isoformas *OsHKT1* y *OsHKT4* son transportadores específicos de Na^+ de alta y baja afinidad

respectivamente; en cambio, la isoforma *OsHKT2* se comporta como un simportador Na^+/K^+ (Horie *et al.*, 2001; Garcíadeblas *et al.*, 2003). El transporte de alta afinidad de Na^+ de *OsHKT1* se inhibe en presencia de 1 mM de K^+ , sin embargo su capacidad para transportar K^+ sigue siendo residual (Garcíadeblas *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, análisis genéticos y electrofisiológicos indican que, su única isoforma, *AtHKT1* desarrolla varias funciones fisiológicas relativas al transporte específico de Na^+ . Como se expone en el apartado I.4.A.1. de esta Tesis, el patrón de contenidos iónicos del mutante *hkt1* de *Arabidopsis* y la expresión preferencial de *HKT1* en las células parenquimáticas del xilema de la vasculatura foliar, son ambos resultados que confirman el papel de este transportador en la descarga selectiva de sodio desde los vasos del xilema para su almacenamiento vacuolar y/o su recirculación floemática desde la parte aérea a la raíz, protegiendo de este modo al tejido foliar del estrés salino (Sunarpi *et al.*, 2005). Aunque la exportación floemática de Na^+ desde las hojas podría ayudar en la reducción de los niveles salinos en la parte aérea, es importante tener en cuenta que la retranslocación de sal desde la hoja es reducida en comparación con la cantidad de sales importadas en el torrente de transpiración (Munns, 2005). Las plantas transpiran aproximadamente 50 veces más agua de la que retienen en sus hojas. Los flujos estimados de Na^+ y Cl^- en el xilema y floema de cebada indican que su exportación por el floema desde la hoja representa solo el 10% de la importación por parte del xilema. Como se ejemplifica con el arroz (Ren *et al.*, 2005), para evitar la sobreacumulación de sales en la parte aérea, la recuperación de iones del xilema mediante *HKT1* sería una mejor estrategia halotolerante que su exportación desde el floema. Las evidencias acumuladas del análisis genético de los transportadores de Na^+ *SOS1* y *AtHKT1* establecen que la nutrición de K^+ está vinculada a la homeostasis de Na^+ de una forma mucho más compleja que el ampliamente aceptado modelo de competición del Na^+ y el K^+ por los transportadores que median en la absorción de potasio. En los mutantes *sos* la extrusión al medio del Na^+ en exceso se encuentra impedida debido a la ausencia de actividad *SOS1* en la epidermis de la raíz (Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002). *SOS1* se localiza en las células del parénquima de la raíz donde contribuye a la entrada de Na^+ al xilema para su translocación a la parte aérea a través del torrente de transpiración (Shi *et al.*, 2002). Así pues, las plantas mutantes *sos* en condiciones de crecimiento fisiológicas, acumulan el Na^+ en la raíz y ven reducido su contenido en la parte aérea (Shi *et al.*, 2002; Rus *et al.*, 2004). Como se discutió en el apartado I.4.A.1., en esta situación de carga xilemática reducida, el aumento del contenido de Na^+ en la estela de la raíz debido a la recirculación del Na^+ desde las hojas a través del floema jugaría en detrimento de la planta y podría evitarse mediante la inactivación de *AtHKT1*. De hecho, los mutantes aislados *sos3* y *hkt1* presentan una sobreacumulación de Na^+ en la raíz y la parte aérea respectivamente, en tanto que el doble mutante *sos3 hkt1* presenta una distribución de sodio más equilibrada que se acerca más al perfil encontrado en las plantas silvestres (Rus *et al.*, 2004). Por otra parte la sobreacumulación de Na^+ en la estela de la raíz de los mutantes *sos* en un fondo *AtHKT1* silvestre podría impedir el flujo transversal de K^+ a la estela y/o la carga de K^+ en el

xilema en condiciones crecimiento pobres en K^+ . La reducción del contenido de Na^+ en la estela mediada por la mutación de AtHKT1 podría restaurar el flujo de K^+ desde la corteza de la raíz hacia el xilema aliviando así los síntomas de su deficiencia. Así pues las funciones transportadoras del sistema SOS y AtHKT1 se coordinan ajustadamente en el mantenimiento de la homeostasis del Na^+ y el K^+ . El control del transporte a larga distancia de Na^+ podría funcionar de manera diferente en plantas de arroz. El gen *SCK1/HKT8* codifica para una proteína de tipo HKT que ha demostrado ser crítica en la homeostasis de K^+ y en la tolerancia salina de plantas de arroz (Ren *et al.*, 2005; Garcíadeblas *et al.*, 2003). No obstante, a diferencia con los HKTs de *Arabidopsis*, esta proteína abunda principalmente en la raíz y se expresa preferentemente en las células parenquimáticas que rodean los vasos del xilema. En análisis electrofisiológicos, la isoforma SCK1/HKT8 de la variedad *Nona Bokra*, relativamente tolerante a la salinidad, ha demostrado ser más activa en el transporte de Na^+ que su homólogo de la variedad más sensible *Koshihiraki*, hecho que apunta a la actividad de SCK1/HKT8 en la reabsorción de Na^+ del xilema como mecanismo de halotolerancia en la variedad *Nona Borra* (Ren *et al.*, 2005). Si SCK1/HKT8 se coordina con el homólogo de SOS1 en arroz para la regulación de la carga neta de Na^+ al xilema, aún está por determinar. Tampoco se conoce si en arroz existe un homólogo funcional de AtHKT1 que permita la recirculación de Na^+ a través del floema contribuyendo así a la restricción de la acumulación de Na^+ en las hojas.

Por otro lado, Shabala *et al.* (2005) han sugerido que SOS1 podría afectar a la nutrición del K^+ de una forma indirecta a través del control de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. En ausencia de estrés salino, la medida de los flujos de protones en células de la raíz madura de mutantes de *Arabidopsis sos1 sos2* y *sos3* resulta inferior a la encontrada en las plantas control, aunque los potenciales de membrana no presentan diferencias significativas. En cambio, en el ápice de la raíz el potencial de membrana es inferior (-101 mV) en el mutante *sos1* que en el silvestre (-121 mV). Estos datos sugieren que la actividad basal de SOS1 podría beneficiar al bombeo de protones, que en consecuencia facilitaría la absorción del K^+ por la raíz. Alternativamente, la despolarización de la membrana ocasionada por la acumulación de Na^+ debida a mutación *sos1* podría perjudicar a la homeostasis de K^+ a través de la estimulación anormal de los canales de salida de K^+ dependientes de voltaje.

Datos recientes implican al canal AKT1 en la deficiencia de K^+ inducida por el exceso de Na^+ (Qi y Spalding, 2004). En medios de crecimiento con niveles milimolares de NH_4^+ , capaces de bloquear al resto de transportadores de K^+ , las plantas de *Arabidopsis* dependen del canal AKT1 para la absorción fisiológicamente significativa de K^+ . En un medio libre de Na^+ con niveles elevados de NH_4^+ , la absorción de K^+ dependiente de AKT1 en la raíz de mutantes *sos* resulta normal y el crecimiento de estos mutantes exhibe una dependencia de K^+ similar a la del silvestre. En cambio, la adición de 50 mM de NaCl inhibe fuertemente la permeabilidad al K^+ de las células de la raíz y reduce el crecimiento de las plantas mutantes *sos1*, pero no de las silvestres. Es más, la

adición de 10 mM de NaCl directamente al citoplasma de células de la raíz de plantas silvestres inhibe completamente la actividad del canal de K⁺ AKT1. Estos datos sugieren que los niveles elevados de Na⁺ citoplásmico, resultantes de la pérdida de la actividad de SOS1, deterioran la permeabilidad al K⁺ en las células de la raíz. Además, dicha sobreacumulación de Na⁺ en la estela radical de los mutantes *sos1* podría resultar en la inhibición de otros transportadores de potasio implicados en su transporte a larga distancia. Es el caso del canal SKOR (*shaker-like K⁺ outward rectifying channel*) que, localizado en la estela vascular de la raíz, está implicado en el flujo de K⁺ al xilema para su distribución desde la raíz a la parte aérea (Gaymard *et al.*, 1998). Con todo, en tanto que los mutantes *akt1* son sensibles al Na⁺ durante su desarrollo temprano, los mutantes *skor* no resultan afectados, lo que sugiere que el efecto nocivo del Na⁺ sobre el transporte del potasio a través de canales es probablemente más importante a nivel de su absorción que a nivel de su descarga al xilema (Qi y Spalding, 2004).

I. 9. Sistema CBL/CIPK de señalización celular.

I. 9. A. Familia de kinasas CIPKs de *Arabidopsis* y arroz.

En contraste con la calmodulina, que interacciona con un grupo muy diverso de efectores proteínicos como por ejemplo kinasas, transportadores de iones o factores de transcripción (Yang y Poovaiah, 2003), los sensores CBLs interaccionan específicamente con un grupo muy concreto de proteína-kinasas designado en consecuencia CIPKs (del inglés *CBL-interacting protein kinases*) (Shi *et al.*, 1999; Halfter *et al.*, 2000). Este grupo de kinasas CIPKs constituye una nueva familia de kinasas de serina/treonina específicas de plantas que posee similitud estructural con la kinasa SNF1 (*sucrose non-fermenting*) de levadura y con las kinasas dependientes de AMPc (*AMP-activated protein kinase*) de animales (Albrecht *et al.*, 2001; Luan *et al.*, 2002). Debido a esta similitud estructural, las CIPKs fueron inicialmente incluidas en el sub-grupo SnRK3 de kinasas similares a SNF1 o SNFL (SNF-Like) (Hrabak *et al.*, 2003). Sin embargo las CIPKs son funcionalmente distintas a las kinasas SNFL y presentan mecanismos de acción y regulación claramente diferenciados (Kolukisaoglu *et al.*, 2004) por lo que posteriormente se incluyeron en una familia independiente de kinasas CIPKs.

Mediante estudios bioinformáticos se han encontrado 25 isoformas de CIPKs codificadas en el genoma de *Arabidopsis* y 30 isoformas en el genoma de arroz (Albrecht *et al.*, 2001; Kolukisaoglu *et al.*, 2004). En ambas especies, la familia de kinasas CIPK diverge en dos ramas filogenéticamente antiguas de genes con y sin intrones. Las proteínas CIPKs presentan un extremo aminoterminal conservado que contiene al dominio catalítico de tipo kinasa SNF1 y que exhibe una elevada identidad de secuencia entre las distintas isoformas (51-90% residuos aminoácidos idénticos). El extremo carboxiterminal regulatorio presenta una mayor variabilidad entre las distintas isoformas (24-58%) y que no está presente en otras kinasas de tipo SNF1 (Kolukisaoglu

et al., 2004). El dominio catalítico de las CIPKs alberga un bucle de activación con un residuo de treonina que, localizado entre los motivos amino y carboxiterminales DFG y APE respectivamente, puede representar una diana de fosforilación por otras protein kinasas. De hecho, en la isoforma SOS2/CIPK24, la mutación puntual de este residuo de treonina-168 a aspartato genera una enzima constitutivamente activa cuya actividad kinasa es independiente del sensor CBL (Guo *et al.*, 2001). Este hallazgo apunta a la actividad de otra kinasa, aún por identificar, que regule la actividad de las CIPKs y que, en consecuencia, proporcione un punto de regulación adicional que pueda interactuar con otros elementos de señalización celular. A este respecto hay que destacar que las CDPKs, otro importante sistema kinasa calcio-dependiente de la célula vegetal, también requieren de la trans-fosforilación por kinasas anónimas para desarrollar su completa actividad kinasa (Romeis *et al.*, 2001).

En el extremo carboxiterminal regulatorio de las CIPKs, un dominio de 24 aminoácidos designado NAF debido al motivo conservado Asn-Ala-Phe que incluye, fue identificado como suficiente y necesario para mediar la interacción con el sensor CBL (Albrecht *et al.*, 2001). Este mismo dominio ha sido denominado FISL por Guo *et al.*, 2001. La naturaleza hidrofóbica de este dominio sugiere una interacción de tipo lipofílica entre CBLs y CIPKs, lo que es consistente con los datos de cristalización de SOS3 que indican que su dimerización en respuesta la unión de Ca^{++} resulta en la exposición de una zona hidrofóbica que podría interactuar con SOS2 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2005). El dominio de interacción NAF/FISL (en adelante NAF) esta altamente conservado en todas las kinasas de tipo CIPKs y en consecuencia define a estas proteínas como dianas de las señales de calcio transmitidas mediante los sensores de calcio tipo CBL. Adicionalmente el dominio NAF ha demostrado ejercer una función autoinhibitoria sobre la actividad kinasa pues la delección del mismo resulta en una kinasa constitutivamente activa e independiente de CBL (Guo *et al.*, 2001). La formación preferencial de complejos entre determinadas isoformas de CBLs y CIPKs ha sido considerada como uno de los mecanismos de especificidad espacio-temporal de la señal de calcio en la célula vegetal (Kim *et al.*, 2000; Albrecht *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001). Puesto que el dominio NAF por sí solo es insuficiente para definir la especificidad de la interacción con el sensor, otras regiones de la proteína alrededor del dominio de interacción o más alejadas, podrían ser las responsables del alto grado de especificidad de la interacción entre CBLs y CIPKs (Kim *et al.*, 2000; Albrecht *et al.*, 2001). Un nuevo dominio ha sido identificado recientemente como responsable de la interacción entre las proteínas CIPK y las protein-fosfatasas de tipo 2C ABI1 y ABI2 (Ohta *et al.*, 2003). Este dominio, denominado PPI (*protein phosphatase interaction*) se localiza en el extremo carboxiterminal de la kinasa y está constituido por 37 aminoácidos que albergan una cierta homología con la kinasa CHK1, implicada en la reparación del ADN. El dominio complementario en las fosfatasas ABI responsable de la interacción con las CIPKs se localiza en su extremo aminoterminal. Notablemente, la substitución de la glicina conservada en la posición 168 por un aspartato, como ocurre en la proteína mutante

abi2-1, impide la interacción entre la fosfatasa y CIPK24/SOS2 (Ohta *et al.*, 2003). En experimentos posteriores se demuestra que las distintas isoformas de CIPKs exhiben diferentes afinidades hacia las fosfatasas ABI1 y ABI2 (Ohta *et al.*, 2003). Actualmente se están investigando las posibles implicaciones funcionales de esta nueva interacción entre las kinasas CIPK y las fosfatasas de tipo ABI y si se trata de una característica general a todas las isoformas CIPKs.

I. 9. B. Familia de sensores CBLs de *Arabidopsis* y arroz.

Este grupo de sensores de calcio se identificó originalmente en base a su similitud con la subunidad reguladora de la calcineurina B (CNB) y con los sensores neuronales de calcio (NCS) de animales, y consecuentemente se designaron proteínas SCaBPs (del inglés *small Ca⁺⁺ binding proteins*) o CBLs (del inglés *calcineurin B-like*) (Liu y Zhu, 1998; Kudla *et al.*, 1999) (en adelante CBLs). Tanto en *Arabidopsis thaliana* como en *Oryza sativa* esta familia de genes comprende 10 miembros (Kolukisaoglu *et al.*, 2004) que pese a su elevada identidad genética parecen exhibir funciones diferenciadas (Kolukisaoglu *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2004). A pesar del idéntico número de genes CBLs codificados en los genomas de *Arabidopsis* y arroz, sus familias de sensores parecen proceder de vías evolutivas distintas y en consecuencia la predicción de funciones entre los homólogos de ambas especies podría resultar problemática.

La estructura global de los sensores CBLs es similar a la de CNB y NCS en el sentido que estos polipéptidos están plegados en dos dominios globulares separados por un corto dominio de unión (Nagae *et al.*, 2003). Las proteínas CBL se caracterizan por un motivo estructural común hélice-bucle-hélice denominado EF-hand que actúa como dominio de unión al ión Ca⁺⁺ (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Este dominio EF-hand está formado por un bucle de 12 aminoácidos flanqueado por dos hélices alfa cortas en el cual los aminoácidos en las posiciones 1(X), 3(Y), 5(Z), 7(-Y), 9(-X) y 12(-Z) son críticos en la unión al ión Ca⁺⁺ (Lewit-Bentley y Réty, 2000). Cada isoforma de CBL comprende cuatro dominios EF-hand con diversos grados de conservación de secuencia con respecto a su secuencia canónica. Notablemente, el primer dominio EF-hand de todas las isoformas CBL exhibe cambios aminoacídicos con residuos carentes de oxígeno (Ala, Val, Ile o Cys) en los sitios 1(X) y/o 3(Y). En el caso de los NCS, sustituciones aminoacídicas similares incapacitan al dominio EF-hand para la unión a calcio; en contrapartida este dominio “afuncional” media en la interacción de estos sensores con sus proteínas diana correspondientes (Burgoyne y Weiss 2001). El número así como el espaciamiento entre los dominios EF-hand está absolutamente conservado en todas las isoformas conocidas de CBLs (Kolukisaoglu *et al.*, 2004) lo que podría sugerir una estructura tridimensional común de todos los CBLs de plantas. La estructura cristalina de AtCBL2 ha sido resuelta recientemente con una resolución de 2.1 Å (Nagae *et al.*, 2003). En cuanto al plegamiento global de la proteína, su estructura es similar a las estructuras de CNB y NCS, pero su conformación local difiere significativamente. Cada molécula de AtCBL2 se une a dos iones Ca⁺⁺, ambos coordinados en el primer y cuarto motivo EF-hand,

mientras que el segundo y tercer motivo EF-hand se mantienen en una disposición abierta debido a puentes de hidrogeno, sin coordinarse a ningún ión Ca^{++} . La composición no canónica de aminoácidos encontrada en los cuatro dominios EF-hand de AtCBL2 está también presente en otras proteínas CBLs (AtCBL3 a AtCBL5; Kolukisaoglu *et al.*, 2004) lo que podría resultar en similares o idénticas propiedades de unión a Ca^{++} . En cambio, las restantes proteínas CBLs de *Arabidopsis* exhiben una composición aminoacídica diferente de sus dominios EF-hand por lo que sus afinidades por Ca^{++} podrían variar. Por ejemplo, AtCBL6 tiene una delección en el primer dominio EF-hand que lo inhabilitaría para su unión a Ca^{++} (Nagae *et al.*, 2003). Adicionalmente las isoformas AtCBL1 y AtCBL9 tienen una composición canónica de aminoácidos en los motivos EF-hand tercero y cuarto que, en contraste con la situación de AtCBL2, podría aumentar su afinidad por el Ca^{++} (Nagae *et al.*, 2003; Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Así pues, la determinación de las estructuras cristalinas de los restantes miembros de esta familia de sensores CBLs será necesaria para ahondar en el entendimiento de la regulación de esta red de sensores a nivel de su unión a Ca^{++} .

Determinadas características estructurales de las proteínas CLBs sugieren que estos sensores de Ca^{++} podrían cambiar su localización celular para funcionar en diferentes compartimentos subcelulares. Tanto la calcineurina B como casi todos los NCS son modificados por el ácido graso saturado miristato. La miristoilación tiene lugar en una secuencia diana localizada en el extremo aminoterminal (MGXXXS/T) de la proteína, más concretamente en la glicina que sigue a la primera metionina (Farazi *et al.*, 2001). La unión covalente al miristato es catalizada co-traduccionalmente por la N-myristoil transferasa previa eliminación de la metionina inicial por la N-aminopeptidasa. La miristoilación juega a menudo un papel crucial en la interacción proteína-proteína o en la unión de la proteína a membranas. No obstante la hidrofobicidad de los péptidos miristoilados generalmente no es suficiente para su anclaje a las membranas por lo que para estabilizar dicha unión a menudo un grupo palmitoilo se adiciona post-traduccionalmente a un residuo de cisteína adyacente a la glicina miristoilada (Bijlmakers y Marsh 2003). En todos los CBLs miristoilables el residuo conservado de glicina se sitúa junto a una cisteína, lo que sugiere que estas proteínas podrían ser adicionalmente sustrato de palmitoilación. Las secuencias aminoterminales de cuatro isoformas de *Arabidopsis* (AtCBL1, 4, 5 y 9) y cinco de arroz (OsCBL1, 4, 5, 7 y 8) albergan motivos conservados de miristoilación. La miristoilación ha demostrado ser un requisito imprescindible para el funcionamiento de AtCBL4/SOS3, ya que la activación de SOS1 por complejo SOS2/SOS3 requiere su reclutamiento a la membrana plasmática por el sensor SOS3 debidamente miristoilado (Ishitani *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2002). Estudios de localización utilizando fusiones de la proteína de medusa GFP a distintas isoformas CBLs ha revelado que tanto CBL1, como CBL9 se localizan en la membrana plasmática (Batistic y Kudla, 2004). Notablemente la mutación del motivo de miristoilación suprime completamente la asociación de estas proteínas a la membrana plasmática. Así pues, esta modificación lipídica dual

de las proteínas CBLs puede jugar un papel crucial en la localización de los sensores CBLs así como sus quinasas interaccionantes en la membrana plasmática, permitiendo así la fosforilación de proteínas sustrato asociadas a membrana. Es más, la naturaleza temporal de la palmitoilación podría proporcionar un nivel adicional de regulación mediante la asociación reversible a la membrana plasmática (Bijlmakers y Marsh, 2003).

I. 9. C. Mecanismos de especificidad de la señal de calcio.

La mayoría, si no todos, los procesos de señalización en plantas se acompañan de cambios en la concentración del Ca^{++} intracelular (Gilroy y Trewavas, 2001). Diferencias sutiles en cada señal de Ca^{++} particular constituyen la “contraseña” que precisa ser decodificada para generar una respuesta específica para cada tipo de señal. El sistema CBL/CIPK de *Arabidopsis* proporciona una combinación de 10 sensores y 25 quinasas efectoras, donde factores como su expresión génica, su localización subcelular, su afinidad por calcio y la especificidad de la interacción CBL/CIPK, juegan un papel crucial en la decodificación de cada “firma” específica de calcio.

a) Patrón de expresión génica y localización subcelular.

La decodificación de una determinada señal de Ca^{++} depende ampliamente de la presencia y localización subcelular de los elementos necesarios para la transmisión de dicha señal. Los patrones de expresión de los genes *CBLs* y *CIPKs* estudiados hasta el momento difieren significativamente entre las distintas isoformas. Por ejemplo la expresión en raíz de los sensores de calcio *CBL1* y *CBL9* está restringida al ápice y a la estela vascular (Pandey *et al.*, 2004), sin embargo en tanto que la expresión de *CBL1* se induce fuerte y transitoriamente por la sequía, la sal o el frío, y es insensible al ABA exógeno (Albrecht *et al.*, 2003); la expresión de *CBL9* se induce específicamente por el ácido abscísico (Pandey *et al.*, 2004). De manera similar la expresión de *CIPK9/PKS6* se ha detectado en casi todos los tejidos salvo en raíces y se induce principalmente por ABA y débilmente por la sal y la sequía (Gong *et al.*, 2002b). En cambio la expresión de *CIPK8/PKS11* se localiza principalmente en la raíz y no se induce por ningún tipo de estrés (Gong *et al.*, 2002a). En conjunto los patrones de expresión específicos de los distintos *CBLs* y *CIPKs* y su solapamiento amplían y mejoran las posibilidades del sistema para responder de una forma dinámica a los cambios ambientales y las necesidades del desarrollo. Un aspecto importante de la señalización por calcio es su restricción a determinados compartimentos subcelulares, por tanto para conservar esta especificidad espacial el sistema decodificador se ve obligado a mantener esta separación local de los procesos de señalización. A este respecto la miristoilación de determinadas isoformas de CBLs (AtCBL1, 4, 5 y 9) juega un papel crucial pues les permite asociarse a determinados compartimentos subcelulares como la membrana plasmática o el tonoplasto, dirigiendo asimismo la localización de su complejo CBL/CIPK.

b) Afinidad por calcio

En animales, los distintos sensores de calcio neuronales (NCS) difieren no sólo en sus patrones de expresión y localización subcelular sino también en su afinidad y mecanismos de unión a Ca^{++} (Burgoyne y Weiss, 2001), lo que les permite descodificar las distintas señales específicas de Ca^{++} en un amplio rango de concentraciones. Estudios similares de los sensores CBL de plantas están aún en desarrollo, pero las diferencias observadas en la composición aminoacídica de sus dominios EF-hand sugieren diferentes afinidades por el ión Ca^{++} e incluso diferentes mecanismos de unión a Ca^{++} . A este respecto, la familia de sensores CBLs de *Arabidopsis* podría clasificarse en proteínas con un dominio EF-hand canónico (AtCBL6, 7, 8, 10); con dos dominios EF-hand canónicos (AtCBL1, 9); y con ningún dominio EF-hand canónico (AtCBL2, 3, 4, 5) (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Adicionalmente la formación del complejo CBL-CIPK podría ser dependiente de Ca^{++} lo que proporcionaría un nivel añadido de regulación por el ión Ca^{++} . Este es el caso del complejo CBL1-CIPK1 cuya interacción *in vitro* requiere niveles micromolares de calcio (Shi *et al.*, 1999).

c) Especificidad de la interacción CBL/CIPK.

La estructura del sistema CBL/CIPK en un principio sugiere un número elevado de combinaciones entre los distintos CBLs y CIPKs. En cambio, los datos experimentales sugieren la formación preferencial de complejos entre determinados CBLs y CIPKs, hecho que se ha interpretado como uno de los principales mecanismos de especificidad en este tipo de vías de señalización (Guo *et al.*, 2001, Albretch *et al.*, 2001). Estos resultados confirman que, incluso si distintos CBLs y CIPKs coexisten en una determinada célula vegetal que tuviera que procesar simultáneamente distintas señales de calcio, la selectividad en la formación del complejo CIPK/CBL permitiría mantener dicha especificidad en la transmisión de la señal.

II. OBJETIVOS.

La activación bioquímica del intercambio Na^+/H^+ del antiportador de *Arabidopsis* SOS1 mediante la fosforilación por la kinasa SOS2 se ha demostrado mediante la co-expresión heteróloga de las proteínas SOS en una cepa de levadura halosensible que carece de los transportadores de sodio endógenos (Quintero *et al.*, 2002). Adicionalmente se observó que el complejo kinasa SOS2/SOS3 promovía la fosforilación de SOS1 en fracciones de membrana plasmática de levadura, y que la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308, aislada de bacterias era capaz de fosforilar *in vitro* al antiportador SOS1 purificado. Aunque en conjunto los antecedentes experimentales apuntan a la fosforilación del antiportador como el mecanismo de activación por la kinasa, aún se desconoce el dominio de reconocimiento y fosforilación por SOS2 y no existen evidencias que demuestren una relación directa entre esta fosforilación y la activación del antiportador. Uno de los objetivos en los que se centra esta tesis, y cuyos resultados experimentales se recogen en el capítulo I, es la caracterización molecular del mecanismo de activación del antiportador SOS1 por la kinasa SOS2 mediante la identificación del dominio de fosforilación de SOS1 y la posterior caracterización funcional de mutantes puntuales en la(s) diana(s) de fosforilación identificadas.

En el momento de iniciar esta tesis la existencia del sistema SOS tan sólo se había descrito en la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo ya había indicios de la existencia de posibles homólogos del antiportador SOS1 en otras especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas. Aprovechando la reciente secuenciación genómica de la monocotiledónea *Oryza sativa*, se planteó como objetivo la identificación y caracterización molecular de los homólogos funcionales de arroz de cada una de las tres proteínas del sistema SOS (SOS1, SOS2 y SOS3) de *Arabidopsis*. El conjunto de resultados experimentales encaminados a la realización de dicho objetivo se exponen en el capítulo II de esta Tesis.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. Material Biológico.

III. 1. A. Material Vegetal.

III. 1. A. 1. *Arabidopsis thaliana*.

Se han utilizado plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Columbia glabrous 1* silvestre y mutantes *sos1-1* (Wu *et al.*, 1996), *sos2-2* (Zhu *et al.*, 1998) y *sos3-1* (Liu *et al.*, 1997) procedentes de semillas cedidas por el laboratorio del Dr. Jian-Kang Zhu (Universidad de California Riverside).

III. 1. A. 2. *Oryza sativa*.

Se han empleado plantas de arroz (*Oryza sativa* cv *Nipponbare*) procedentes de semillas cedidas por el Dr. Alonso Rodríguez-Navarro (Universidad Politécnica de Madrid).

III. 1. B. Estirpes usadas.

III. 1. B. 1. Bacterias.

Para la transformación y propagación de plásmidos se emplearon las estirpes XL1-Blue, XL10 gold y ER2925 (Tabla 1) de la bacteria *Escherichia coli*. Esta última carece de las metilasas DAM y DCM por lo que ha sido de utilidad en la propagación de plásmidos para su restricción en sitios sensibles a metilación. Y para la obtención de proteínas recombinantes se empleó la estirpe BL21(DE3) (Tabla1) de la misma bacteria. Ésta lleva integrado en su genoma el gen de la polimerasa de ARN del bacteriófago T7 bajo el promotor *LacUV5* de manera que en presencia del inductor IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) proporciona altos niveles de expresión de genes clonados en vectores bajo el control del promotor T7. Adicionalmente carece de las proteasas OmpT y Lon por lo que resulta de especial utilidad en la purificación de proteínas recombinantes. Para transformar los primordios seminales de *A. thaliana* se empleó la estirpe GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, la cual porta los genes *vir* en el plásmido pMP90 de resistencia a la gentamicina (Koncz y Schell, 1986).

III. 1. B. 2. Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

Las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* usadas en este trabajo se describen a continuación:

III. 1. B. 2. a. *S. cerevisiae* AXT3K ($\Delta ena1::HIS3::ena4$, $\Delta nha1::LEU2$, $\Delta nhx1::Kan MX4$). Fue construida por Quintero *et al.* (2002) a partir de la cepa ANT3 ($\Delta ena1::HIS3::ena4$, $\Delta nha1::LEU2$), ambas derivadas de la estirpe silvestre W3031B (*MAT α* , *ura 3-1 leu 2-3, 112 his 3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100*). Se trata de una cepa de levadura que carece de los principales transportadores de Na⁺ necesarios para su tolerancia salina: las ATPasas de Na⁺ ENA1-4 y el antiportador Na⁺K⁺/H⁺ NHA1, localizados en la membrana plasmática (Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995; Bañuelos *et al.*, 1998); y el antiportador Na⁺/H⁺ NHX1 situado en el retículo endoplasmático (Nass *et al.*, 1997; Darley *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2000). Presenta por lo tanto un fenotipo de halosensibilidad severa y ha sido de gran utilidad en la caracterización funcional de proteínas transportadoras de Na⁺ procedentes de plantas (Dreyer *et al.*, 1999).

III. 1. B. 2. b. *S.cerevisiae* JP890 ($\Delta ena1::HIS3::ena4$, $\Delta nha1::LEU2$, $\Delta nhx1::KanMX4$ *CYC1::[PGK1:SOS1:CYC1]*). Se trata de un derivado de la cepa mutante y se construyó mediante la inserción puntual del casete de expresión *PGK1:AtSOS1:CYC1*, procedente del vector pSOS1-1 (Quintero *et al.*, 2002), en el terminador del gen *CYC1* de la levadura (Guo *et al.*, 2004). La localización cromosómica del transgén y la utilización del promotor *PGK1* proporcionan una expresión moderada y constitutiva del transportador de *Arabidopsis* AtSOS1 en el fondo genético AXT3K.

III. 1. B. 2. c. *S.cerevisiae* JP1021 ($\Delta ena1::HIS3::ena4$, $\Delta nha1::LEU2$, $\Delta nhx1::KanMX4$ *PMA1::[PMA1:OsSOS1:ADH1]*). Se trata igualmente de un derivado de la cepa mutante AXT3K y se construyó mediante la inserción puntual del casete de expresión *PMA1:OsSOS1:ADH1*, procedente del vector pDROsSOS (Apartado IV/II.2.), en el promotor del gen *PMA1* de la levadura. Para ello, en el vector pDROsSOS1 se inactivó el marcador *URA3* y el origen de replicación en la levadura (*2 μ*) mediante la eliminación de un fragmento *ApaI-SnaBI* de aproximadamente 1,3 Kb y subsiguiente religación del vector resultante. El vector así obtenido se digirió en el promotor *PMA1* con la enzima *KpnI* y una vez linealizado se insertó al completo en el mismo promotor *PMA1* del genoma de la levadura AXT3K transformada con el complejo AtSOS2/SOS3 (pFL32T). La selección de los transformantes se realizó en placas de medio AP suplementadas con 200 mM de NaCl, en base al aumento de la halotolerancia conferido por SOS1 en presencia del complejo SOS2/SOS3. Una vez seleccionados los transformantes, el vector pFL32T se eliminó mediante crecimiento en medio rico no selectivo, y su actividad SOS1 se reensayó para confirmar su correcta inserción. Al tratarse de una inserción puntual el casete de expresión *PMA1:OsSOS1:ADH1* se insertó sin interrumpir la funcionalidad del promotor *PMA1* endógeno (Figura 6). La localización cromosómica del transgén y la

utilización del promotor *PMA1* proporcionan una expresión moderada y constitutiva del transportador de *Oryza OsSOS1*, en el fondo genético AXT3K.

III. 2. Medios y condiciones de crecimiento.

En todos los casos los medios se esterilizaron por autoclave durante 20 min a 120°C y 2 atmosferas de presión. Los medios sólidos se conservaron a 4°C por un máximo de dos meses, mientras que los medios líquidos se almacenaron a temperatura ambiente. La suplementación con antibióticos y otros compuestos termolábiles se realizó una vez autoclavado el medio, con una solución 1000X del antibiótico esterilizada por filtración (0,22 µm).

III. 2. A. Bacterias.

Las bacterias se crecieron en medio Luria-Bertani (1% bacto-tryptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl) a 37°C (*E. coli*) o 30°C (*A.tumefaciens*). En determinadas aplicaciones se utilizó un tipo de LB modificando (LBK) que sustituye la sal sódica por 1% KCl. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos el medio se suplementó con 50-100 mg/L de ampicilina o 50 mg/L kanamicina. Para solidificar el medio se añadió un 2% de agar. Para preparar *E. coli* competentes se utilizó el medio cultivo SOB (2% bacto-tryptona, 0.5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl) al que una vez autoclavado se añadió 1% de una solución estéril de magnesio (1M MgSO₄-7H₂O, 1M MgCl₂-6H₂O). Para preparar *A. tumefaciens* competentes las bacterias se cultivaron en medio YEP (1% Bacto-Peptona, 1% Extracto de levadura, 0,5% NaCl). Para purificar proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se empleó el medio de crecimiento 2XYT (16g/L triptona, 10g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) suplementado con 100 µg/mL ampicilina (2XYTA). Finalmente, para la conservación de bacterias conteniendo plásmidos de interés se suplementó el cultivo bacteriano con un 15% de glicerol estéril y se guardó a -70°C.

III. 2. B. Levaduras.

Se siguieron las técnicas de manipulación y crecimiento de levaduras descritas en los libros de Guthrie y Fink (1991) y Ausubel *et al.* (1996). Las levaduras se crecieron a 28-30°C. Para el crecimiento rutinario se usó medio rico YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa). Cuando fue necesario el mantenimiento de plásmidos se usó el medio mínimo YNB (0.17% YNB sin aminoácidos, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 2% dextrosa) al que se añadieron los aminoácidos necesarios para cada cepa a las concentraciones indicadas en Ausubel *et al.* (1996) y el pH se ajustó a 6.0 con NaOH. Para solidificar los medios se añadió en ambos casos 2% de agar. Para el crecimiento de levaduras en condiciones de bajo potasio se utilizó el medio AP, descrito por Rodríguez Navarro y Ramos (1984), compuesto por 8 mM H₃P₀₄, 2 mM SO₄Mg,

0.2 mM CaCl₂, y 2% glucosa, llevando el pH a 6.5 con L-arginina hasta una concentración final de 10 mM; más vitaminas (0.02 mg/mL biotina, 0.4 mg/L niacina, 0.4 mg/L piridoxina, 0.4 mg/L tiamina y 0.4 mg/L ácido pantoténico) y elementos traza (0.5 mg/L de H₃BO₃, 0.04 mg/L de CuSO₄, 0.1 mg/L de IK, 0.2 mg/L FeCl₃, 0.4 mg/L MnSO₄·H₂O, 0.2 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O y 0.04 mg/L ZnSO₄·7H₂O. Este medio carece de K⁺ y otros cationes alcalinos. Para realizar los ensayos de tolerancia salina de levaduras se añadió 1mM de KCl y se suplementó con NaCl a las concentraciones indicadas en cada caso. Las cepas de interés se guardaron a -70° C después de añadir 15% de glicerol estéril a una suspensión de células en medio de cultivo.

III. 2. C. *Arabidopsis thaliana*.

En función de los requerimientos de cada experimento, se emplearon dos formas distintas de cultivo de *A. thaliana*, el cultivo en suelo y el cultivo *in vitro*.

III. 2. C. 1. Crecimiento y propagación en suelo.

Se empleó fundamentalmente en la propagación de plantas para recolección de sus semillas.

III. 2. C. 1. a. Siembra y germinación.

Como medio de crecimiento se utilizó principalmente turba negra, que se autoclavó previamente durante 30 minutos para eliminar posibles plagas. Para la siembra de plantas en macetas o semilleros, el sustrato se humedeció y las semillas se esparcieron uniformemente utilizando un papel de filtro a una densidad de 5-10 semillas/dm². Las macetas o semilleros se cubrieron con plástico transparente para evitar las pérdidas de humedad y se colocaron durante 48 h a 4° C para vernalizar las semillas. Transcurrido dicho periodo éstas se transfirieron a la cámara de cultivo. A los 7 u 8 días de iniciado el proceso de germinación se retiró el plástico y se mantuvo un régimen de riego de 2-3 veces por semana. Bajo estas condiciones, y manteniendo el ciclo lumínico en día largo, las plantas de *Arabidopsis* florecen aproximadamente en la quinta semana de desarrollo y completan su ciclo vital en la octava.

III. 2. C. 1. b. Parámetros de crecimiento.

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en cámaras con luz, temperatura y humedad controladas. Se sometieron a un régimen de 16 h de luz (PAR 300 μmol/m² por segundo) a 25°C y 8 h de oscuridad a 20°C con una humedad relativa del 60-40 %. Se les suministró agua por subirrigación según necesidad, teniendo en cuenta que las plantas requieren una mayor irrigación en los primeros días, antes del desarrollo de las hojas verdaderas, y durante la

formación de semillas. Ocasionalmente las plantas se regaron con 0,5X MS durante las fases tardías del crecimiento con objeto mejorar la producción de semillas.

III. 2. C. 1. c. Recolección y conservación de semillas.

Poco después de iniciada la floración las plantas se protegieron con *Aracons*TM (Lehle Seeds) que además de facilitar la recolección de semillas evitan la contaminación cruzada de semillas y la fertilización cruzada de flores de plantas contiguas. Cuando las silicuas hubieron madurado se detuvo la irrigación de la planta para permitir su completa desecación. Sólo entonces se procedió a la recolección de sus semillas cortando las inflorescencias por la base, desprendiendo las silicuas con los dedos y limpiando las semillas con ayuda de tamizaciones sucesivas. Antes de su utilización o almacenamiento las semillas deben alcanzar una humedad relativa del 5-6 %, para ello se guardaron en sobres de papel dentro de cajas herméticas conteniendo gel de sílice que se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1-3 semanas. Para la conservación de las semillas durante períodos de tiempo medios (3-4 años) con accesibilidad frecuente dichas cajas se guardaron a 4° C.

III. 2. C. 2. Crecimiento y propagación *in vitro*.

III. 2. C. 2. a. Esterilización de semillas.

Antes de la germinación la superficie de las semillas se esterilizó mediante lavados sucesivos en etanol al 70% (2 min.), en lejía comercial al 50 % con un 2% de Tween (7 min.) y finalmente cinco lavados en agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas se resuspendieron en una solución agar-agua al 0,2%.

III. 2. C. 2. b. Medios de cultivo.

Se empleó el medio descrito por Murashige y Skoog, (1962) (Tabla 2), suplementado con la mezcla vitamínica de Gamborg *et al.* (1968) que se preparó a partir de una mezcla comercial (Duchefa), adicionando un 3% de sacarosa y ajustando finalmente el pH a 5,7 con KOH 1M. Para solidificar el medio se añadió un 0.8% o un 1.5% de agar según se emplearan las placas en ensayos de crecimiento en horizontal o en vertical respectivamente. Para realizar los ensayos de tolerancia salina se adicionó al medio NaCl a las concentraciones indicadas en cada caso. Y para la selección de plantas transgénicas se suplementó el medio con 50 µg/mL de kanamicina.

III. 2. C. 2. c. Siembra y parámetros de crecimiento.

Antes de la siembra las semillas estériles en agar-agua se incubaron a 4° C durante 3 días con objeto de sincronizar la germinación mediante la vernalización de la semilla. Para sembrar en medios sólidos se distribuyeron las semillas una a una separadamente sobre la superficie del medio tomando las semillas directamente de la solución agar-agua y sembrándolas con ayuda de una punta de pipeta de 1000 µL. Las placas sembradas y convenientemente selladas con parafilm® se incubaron en una cámara de cultivo *in vitro* con iluminación y temperatura controladas (16 h. de luz a 25° C y 8 h. de oscuridad a 20° C). Para sembrar en medios líquidos se añadieron las semillas estériles directamente sobre un matraz erlenmeyer conteniendo la cantidad de medio necesaria. Dicho matraz se incubó en agitación dentro de la cámara de cultivo *in vitro*.

III. 2. C. 2. d. Transplante a medios no estériles.

Aunque sería posible crecer plantas de *Arabidopsis* en esterilidad hasta el desarrollo de sus semillas, en la práctica esto resulta poco útil pues la producción de semillas se ve altamente reducida debido a la excesiva humedad del cultivo *in vitro*. Por consiguiente para poder recolectar semillas se hace necesario el transplante de las plántulas desde medios estériles a tierra. Para ello se prepararon bandejas macetas alveolares de 5 cm de diámetro con turba autoclavada y humedecida con MS al 0.5X. Con la ayuda de unas pinzas se tomaron las plántulas por el hipocotilo, sacándolas del agar con cuidado de no romper sus raíces y se dispusieron, una plántula por alveolo, en pequeños agujeros practicados sobre la tierra. Para mantener la humedad elevada durante los 3-4 días siguientes al transplante se cubrieron las macetas con plástico transparente que se retiró progresivamente una vez las plántulas se hubieron aclimatado.

III. 2. D. *Oryza sativa*.

III. 2. D. 1. Esterilización y germinación.

Antes de la germinación, la superficie de las semillas de arroz se esterilizó mediante lavados sucesivos en etanol 70% (2 min.), en lejía comercial 50% con un 2% de Tween (3 min.) y finalmente, varios lavados en agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas se germinaron en oscuridad, a 28°C y con una humedad relativa del 100% hasta el desarrollo del cotiledón (5 días).

III. 2. D. 2. Cultivo hidropónico.

Las plántulas germinadas se colocaron en un sistema de cultivo hidropónico consistente en cajas con solución nutritiva (8 litros/caja) en aireación que acomodaban hasta 20 plantas cada una. La solución nutritiva, previamente descrita por Miyamoto *et al.* (2001), contenía: : 0,09 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 mM KH_2PO_4 , 0,05 mM KNO_3 , 0,03 mM K_2SO_4 , 0,06 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,07 mM MgSO_4 , 0,11 mM Fe-EDTA, 4,6 μM H_3BO_3 , 1,8 μM MnSO_4 , 0,3 μM ZnSO_4 , 0,3 μM CuSO_4 , pH 5-5,6 (Miyamoto *et al.*, 2001). Para practicar el choque salino el medio se suplementó con 100 mM de NaCl. Las cajas de hidropónico se incubaron en una cámara de ambiente controlado bajo un régimen de 16 h de luz (PAR 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ por segundo) a 25° C y 8 h de oscuridad a 20°C con una humedad relativa del 60-40 %. La solución nutritiva de las cajas se renovaba cada 7 días.

III. 3. Transformación de células.

III. 3. A. Vectores utilizados.

Los vectores utilizados durante esta tesis se describen detalladamente en la tabla 3.

III. 3. B. Transformación de *E. coli*.

III. 3. B. 1. Preparación de células competentes. Método del crecimiento a baja temperatura.

Este método fue descrito por Inoue *et al.* (1990). Con cinco colonias frescas de la estirpe apropiada se inocularon 200 mL de medio SOB en un matraz de 2 L, éste se incubó con agitación vigorosa (150-250 rpm) a 18° C hasta una D.O.600nm de 0,4-0,6. Para alcanzar una eficiencia de transformación óptima el cultivo debe tardar al menos 30 horas en alcanzar dicha densidad. Se recogieron las células centrifugando a 3000 rpm durante 15 min. a 4°C. El sedimento se resuspendió en 67 mL (1/3 vol.) de solución de transformación fría y se incubó en hielo durante 10 min. Las células se volvieron a centrifugar como antes, se resuspendieron con suavidad en 16 mL (1/12,5 vol.) de solución de transformación fría suplementada con un 7% (v/v) de DMSO y se incubaron en hielo durante 10 min. Finalmente la suspensión se dispuso en alícuotas de 0,1 mL que se congelaron rápidamente en N_2 líquido y se conservaron a -70° C.

Para preparar la solución de transformación se disolvieron 10 mM PIPES, 15 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 250 mM KCl en agua milliQ (Millipore®) se ajustó el pH a 6,7-6,8 con KOH 5N y finalmente se añadieron 55 mM MnCl_2 . La solución se esterilizó por filtración (0,22 μm) y se conservó a 4°C.

III. 3. B. 2. Transformación de *E. coli*.

A 100 μ L de células competentes se añadieron 10-100 ng de ADN, en un volumen menor de 10 μ L, y se incubaron en hielo durante 30 min., después se sometieron a un choque térmico de 42° C por 30 segundos y se retornaron inmediatamente a hielo por 5 min. A continuación se les añadió 900 μ L de medio LB y se incubaron a 37° C en agitación durante 30-60 min. Las células se recogieron por centrifugación a baja velocidad y se extendieron en placas de LB con el antibiótico de selección apropiado. Cuando era posible identificar plásmidos recombinantes por inactivación del enzima b-galactosidasa (producido por la combinación de fragmentos codificados por el plásmido y la bacteria receptora), se extendieron 4 μ L de IPTG (200 mg/mL) y 40 μ L X-Gal (20 mg/mL) sobre la superficie de la placa previamente a la siembra de bacterias (Sambrook *et al.*, 1989). Los transformantes se confirmaron por PCR de colonias con los cebadores apropiados o bien mediante restricción enzimática de una preparación de ADN plasmídico del transformante.

III. 3. C. Transformación de *A. tumefaciens*.

III. 3. C. 1. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*.

Se han elaborado siguiendo el protocolo de Holsters *et al.* (1978). Se inocularon 5 mL de medio YEP con una colonia de la estirpe apropiada de *A. tumefaciens* y se incubó a 28°C durante toda la noche. Con 2 mL de este precultivo se inocularon 80 mL del mismo medio y se incubó a 28°C hasta $D.O_{600nm}=0.5-1$. Se recogieron las células por centrifugación a 3000 g y 4°C durante 10 minutos y se resuspendieron en 1.6 mL de 20mM $CaCl_2$ frío. Las células se dispensaron en alícuotas de 100 μ L que se congelaron rápidamente en N_2 líquido y se conservaron a -70°C.

III. 3. C. 2. Transformación de *A. tumefaciens*

A 100 μ L de células competentes se añadió al menos 1 μ g de ADN plasmídico, en un volumen menor de 10 μ L, y se congelaron en N_2 líquido. A continuación, se descongelaron a 37° C durante 5 min., se le añadió 1 mL de medio YEP y se incubaron a 28°C con agitación suave durante 3 horas. Las células se recogieron por centrifugación y se extendieron en cajas Petri con el antibiótico apropiado. Los transformantes se confirmaron por PCR de colonias con los cebadores apropiados o bien retransformando *E. coli* con una preparación del ADN plasmídico de *Agrobacterium* y analizando los transformantes bacterianos por restricción enzimática.

III. 3. D. Transformación de *S. cerevisiae*.

III. 3. D. 1. Método del acetato de litio.

Este método fue descrito por Elble *et al.* (1992) y se empleó para la transformación con vectores sencillos. Se preparó un cultivo inoculando 10 mL de YPD con una colonia de la estirpe apropiada e incubando a 30° C en agitación durante toda la noche. Se recogieron $\approx 2 \times 10^8$ células ($DO_{600nm} = 1$ equivale a $\approx 1 \times 10^7$ células/mL) por centrifugación y se les añadió 1-2 μ g de ADN y 500 μ L de solución PLATE (40% PEG 4000, 0.1 M acetato de litio, 10 mM Tris-CIH, pH 8.0, 1 mM EDTA), mezclando brevemente. Las células se incubaron en esta solución durante 16-24 horas a temperatura ambiente (25°C). A continuación se recogieron las células por centrifugación, se resuspendieron en 100 μ L de medio YNB y se extendieron en placas selectivas incubándolas a 28°C por 48 horas. Para la integración en el genoma de la levadura de fragmentos de ADN mediante recombinación homóloga se empleó una variante de este método (Gietz *et al.* 2002) que mejora considerablemente la eficacia de transformación. Se preparó un cultivo inoculando 50 mL de YPD o YNB con 1-2 colonias de la estirpe apropiada y se incubó a 28°C con agitación hasta alcanzar una $DO_{600nm} \approx 2$. Se recogieron las células por centrifugación lavándolas con 25-50 mL de agua estéril y resuspendiéndolas finalmente en agua a una concentración de 10^9 cél/mL. A 100 μ L de dicha suspensión (10^8 células) se le añadió 1-2 μ g de ADN y 350 μ L de PLATE y se incubó a 42° C durante 45-60 min. A continuación se recogieron las células y se extendieron en placas selectivas como en el método anterior. Los transformantes se confirmaron por PCR de colonias con los cebadores apropiados, o bien retransformando *E. coli* con una preparación del ADN plasmídico de la levadura y analizando los transformantes bacterianos por restricción enzimática.

III. 4. Obtención de plantas transgénicas.

III. 4. A. Preparación de las células de *A. tumefaciens*.

Se ha seguido el protocolo descrito por Bechtold *et al.* (1993). Se inoculó una colonia de *A. tumefaciens* portadora de la construcción a introducir en plantas en 5 mL de medio LB o LBK suplementado con 50 μ g/mL de kanamicina y se incubó a 28° C con agitación durante 36 horas. Con dicho precultivo se inoculó 0,5 L de medio LB o LBK contenido un matraz de 2 L e igualmente suplementado con kanamicina y se incubó como antes hasta alcanzar una $DO_{600nm} \approx 1,8-2,2$. Entonces las células se centrifugaron a 5000 r.p.m. y 4° C durante 10 minutos y se resuspendieron en 200 mL de solución de transformación (0,5X MS, 5% sacarosa, 0,02% silwet L-77 a pH 5,7) de preparación reciente.

III. 4. B. Transformación de plantas de *A. thaliana*.

Se requieren plantas adultas de *Arabidopsis* (4-6 semanas) cultivadas en suelo y que estén iniciando la floración en el momento de ser transformadas. Para aumentar el número de primordios seminales transformables y con ello la eficiencia de la transformación, se podó el primer tallo floral promoviendo así el crecimiento de más tallos florales desde la roseta. La agroinfección se llevó a cabo sumergiendo los tallos florales en la suspensión de *Agrobacterium* durante unos segundos, inmediatamente después se cubrió la parte aérea de la planta con plástico transparente para mantener la humedad alta en las zonas agroinfectadas. Al cabo de 16-24 horas se retiró el plástico y se dispusieron convenientemente los AraconsTM. Se prosiguió el riego normal de la planta hasta la maduración de las silicuas (4-6 semanas), entonces se detuvo progresivamente la irrigación y se recolectaron las semillas.

III. 4. C. Selección de transformantes y propagación.

Las semillas transgénicas (T1) se germinaron *in vitro* en placas de medio MS suplementado con 50 µg/mL de kanamicina. A los 5-8 días desde la germinación se seleccionaron las plántulas que presentaban clara resistencia al antibiótico (verdes con raíces largas) y se transplantaron, con ayuda de unas pinzas estériles, a placas de MS sin el antibiótico. Cuando las plántulas hubieron desarrollado 4-5 hojas verdaderas se transplantaron a suelo y se cultivaron hasta la recolección de sus semillas (T2).

III. 4. D. Presencia, expresión y número de copias del transgén.

Las plantas de *Arabidopsis* (T1) fueron analizadas para comprobar si eran transgénicas, si expresaban el transgén, y también para estimar el número de copias del transgén integradas en su genomio.

III. 4. D. 1. Presencia.

Para ensayar la presencia del transgén se recolectaron 1-2 hojas de la roseta basal de la planta y se procesaron convenientemente para la extracción de ADN genómico. Con éste se realizaron reacciones de PCR con los cebadores apropiados tanto del transgén como del gen de resistencia a kanamicina (oligos NPTII, consultar Anexo I). Adicionalmente se ensayó la integridad de la muestra de ADN genómico mediante una reacción de PCR con cebadores para la tubulina 4 de *Arabidopsis* (oligos TUB4, Anexo I).

III. 4. D. 2. Expresión.

Para ensayar de manera cualitativa la expresión del transgén en la planta, se extrajo ARN de 2-4 hojas de la roseta basal y se analizó por RT-PCR con los cebadores apropiados para

el transgén. Igualmente se ensayó la integridad el ADNc mediante amplificación por PCR de la tubulina 4 de *Arabidopsis* (oligos TUB4, Anexo I).

III. 4. D. 3. Número de copias.

Las flores de las plantas transgénicas fueron autofecundadas para la recolección de sus semillas (T2). Se sembraron unas 100 semillas T2 de cada planta en medio MS con kanamicina. El recuento de segregantes resistentes a kanamicina nos permitió confirmar la presencia y número de copias del transgén.

III. 5. Caracterización de transformantes de levadura.

Los transformantes de levadura expresando las proteínas de interés se caracterizaron mediante dos tipos de ensayos: la determinación del crecimiento en medios salinos y la cuantificación de la acumulación del Na⁺ citoplasmático.

III. 5. A. Ensayos de tolerancia salina.

III. 5. A. 1. Ensayos en medio líquido.

Para medir la velocidad de crecimiento de las células se prepararon cultivos a una DO_{600nm} inicial de ≈ 0.1 en 10 mL de medio AP suplementado con distintas concentraciones salinas, más una muestra control sin sal. Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación y cada 3-4 horas se tomaron alícuotas para medir la densidad de células hasta que el crecimiento se hacía estacionario. Para estimar la velocidad de crecimiento se representó en una gráfica el incremento de los logaritmos de las densidades ópticas ($\log DO_{600nm}$ en eje de ordenadas) en función del tiempo de incubación (horas en el eje de abscisas). En la fase de crecimiento exponencial se hizo un ajuste lineal, siendo el valor de la velocidad de crecimiento el de la pendiente de la recta obtenida.

III. 5. A. 2. Ensayos en medio sólido.

La tolerancia de los transformantes de levadura a distintas concentraciones de sal se ensayó en medio AP sólido determinando su capacidad de formar colonias mediante el método del goteo. Los transformantes a ensayar se inocularon en 2 mL de medio YNB con los aminoácidos necesarios y se incubaron a 28°C hasta saturación ($DO_{600nm} \approx 2-5$) procurando igualar las DO_{600nm} de todos los cultivos antes de iniciar el ensayo. A partir de estos cultivos se hicieron 4 diluciones seriadas 1:10 y se sembraron gotas de 5 μ L de cada una de ellas en placas de AP suplementadas con NaCl a las concentraciones indicadas en cada caso, añadiendo una placa control sin sal. Las placas se incubaron a 28° C durante 3-5 días.

III. 5. B. Cuantificación del sodio intracelular.

Para la medida de la acumulación de Na⁺ citoplasmático se prepararon cultivos de los transformantes a ensayar en 20 mL de AP 1mM KCl líquido suplementado con 30 y 70 mM NaCl. Las levaduras se recogieron durante su crecimiento exponencial (DO_{600nm} ≈ 0,15-0,3) mediante filtración de alícuotas de 5 mL (Vm) de dichos cultivos en filtros millipore® de 0,8 μ (AAWP25). Éstas se lavaron con 15 mL una solución 20 mM MgCl₂ (4,4 g/L) y se recogieron sobre un segundo filtro mediante otro lavado con 10 mL de la misma solución. El filtro conteniendo las células se dispuso en tubos de plástico desechables y se trató con 5 mL (Ve) de líquido de extracción (16,6 mL HCl 37%, 2 g/L MgCl₂) incubándose durante toda la noche a 4°C. Posteriormente mediante espectrometría de emisión atómica (EEA) se determinó el contenido en Na⁺ de la solución y se convirtieron los valores a nmoles Na⁺/mg mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{valor EAA} \times \text{Ve} \times 1,3}{\text{Vm} \times \text{DO}_{600}}$$

III. 6. Caracterización de transformantes de *Arabidopsis*.

III. 6. A. Ensayos de crecimiento en medio salino.

Para realizar los ensayos de tolerancia salina se recolectaron semillas (T2) de las plantas transgénicas T1. Éstas se germinaron *in vitro* en vertical en placas de medio MS suplementado con 50 μg/mL de kanamicina para eliminar los disgregantes no transgénicos. A los 4-5 días se seleccionaron las plántulas que presentaban clara resistencia al antibiótico y se transfirieron con ayuda de unas pinzas estériles a placas de MS1X suplementado con NaCl a las concentraciones indicadas en cada caso. Éstas se incubaron en vertical en una cámara de cultivo *in vitro* con iluminación y temperatura controladas durante 10-15 días.

III. 6. A. 1. Determinación de la elongación de raíces.

Se calculó el crecimiento de las plántulas en medio salino mediante la medida de la longitud de su raíz primaria al inicio y 10-15 días después de su transferencia a medios salinizados. Se promediaron los datos de 3-6 plántulas por cada línea para su representación en gráficos de barras.

III. 6. A. 2. Determinación del peso fresco.

Debido a la aparición de raíces secundarias los datos de elongación de raíz no siempre resultan lo suficientemente significativos por lo que se hizo necesaria la medida del peso fresco, que comprende tanto raíces como parte aérea. Para ello se pesaron las plántulas 10-15 días después del inicio del tratamiento salino en grupos de 3-6 plántulas por pesada y se promediaron los datos para su representación en gráficos de barras.

III. 6. B. Confirmación de mutantes *sos*.

La complementación de los mutantes *sos* de *Arabidopsis* no es definitiva hasta la confirmación mediante PCR de ADN genómico de la presencia de dicha mutación en las líneas aisladas.

III. 6. B. 1. Confirmación de mutantes *sos 1-1*.

El mutante *sos1-1* se obtuvo por mutagénesis química con EMS (etilmetano sulfonato) de semillas silvestres (*Columbia glabrous1*) y se aisló por su deficiente tolerancia salina (Wu *et al.*, 1996). Su mapeo genético indica que se trata de un mutante por delección de 14 pares de bases entre los nucleótidos 1330 y 1343 desde el codon de inicio de *SOS1* (Shi *et al.*, 2000). Por lo tanto para diferenciar un mutante *sos1-1* de un silvestre mediante PCR de ADN genómico se diseñaron los cebadores *sos 1-1_f* y *sos 1-1_r* (Anexo I), que amplificaran una región de 144 pares de bases alrededor de dicha delección de manera que un mutante *sos 1-1* amplificaría un fragmento de menor tamaño (130 pb) discernible del anterior por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

III. 6. B. 2. Confirmación de mutantes *sos 2-2*.

El mutante *sos2-2* se obtuvo por mutagénesis física mediante el bombardeo con neutrones rápidos de semillas silvestres (*Col gl 1*) y subsiguiente selección por halosensibilidad (Zhu *et al.*, 1998). Su mapeo genético indica que se trata de un mutante por delección de los nucleótidos 1521 y 1522 desde el codon de inicio de *SOS2* (Liu *et al.*, 2000). Para diferenciar un mutante *sos2-2* de un silvestre mediante PCR de ADN genómico se diseñaron tres cebadores distintos, uno en sentido, *sos2-2_f*, y dos en antisentido, *sos2-2A_r* y *sos 2-2B_r* (Anexo I), que se diferencian únicamente en las dos últimas pb del extremo 3', las mismas de la delección del mutante *sos2-2*. Por lo tanto el ADN genómico de un silvestre amplificaría una banda de 504 pb únicamente con la pareja de cebadores *sos2-2_f* y *sos2-2B_r*. El mutante por el contrario proporcionaría una banda (502 pb) solamente con la pareja de cebadores opuesta, *sos 2-2_f* y *sos2-2A_r*. Para optimizar la especificidad de dichos oligos se preseleccionaron las temperaturas

de anillamiento de ambas reacciones mediante el ensayo de controles de ADN silvestre y mutante *sos2-2* en un termociclador con gradiente de temperaturas (Biometra® T-gradient).

III. 6. B. 3. Confirmación de mutantes *sos 3-1*.

El mutante *sos3-1* se seleccionó por su deficiente halotolerancia de una colección de semillas silvestres (*Col gl1*) mutadas mediante bombardeo con neutrones rápidos (Liu *et al.*, 1997). Su mapeo genético indica que se trata de un mutante por delección de 9 pb desde el nucleótido 759 a partir del codon de inicio de *SOS3* (Liu *et al.*, 1998). Para la confirmación de mutantes *sos3-1* por PCR de ADN genómico se procedió de manera similar al caso anterior: se diseñaron tres cebadores distintos, uno en antisentido, *sos 3-1_r*, y dos en sentido, *sos 3-1A_f* y *sos 3-1B_f* (Anexo I), que se diferencian en las 9 últimas pb del extremo 3', las mismas de la delección del mutante *sos3-1* de manera que el ADN genómico de un silvestre amplificaría una banda de 419 pb únicamente con la pareja de oligos *sos3-1B_f* y *sos3-1_r* mientras que el mutante sólo proporcionaría banda (410 pb) solamente con la pareja de oligos opuesta, *sos 3-1A_f* y *sos3-1_r*. Igualmente las temperaturas de anillamiento de ambas parejas de cebadores se optimizaron previamente mediante ensayos con ADN control silvestre y mutante *sos3-1* en un termociclador con gradiente de temperaturas (Biometra® T-gradient).

III. 7. Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos.

III. 7. A. Purificación y análisis de ADN

Todo el material de vidrio y plástico se esterilizó por autoclave durante 20 min a 120 °C y 2 atm de presión antes de su uso. Las soluciones se esterilizaron por autoclave en las mismas condiciones. En caso de soluciones termolábiles se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0.22 µm. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada MilliQ (Millipore®).

III. 7. A. 1. Aislamiento de plásmidos.

III. 7. A. 1. a. Minipreparaciones de ADN plasmídico de *E. coli*.

Se ha seguido el método de extracción por lisis alcalina descrito en Sambrook *et al.*, (1989). Células de *E. coli* cultivadas en medio líquido LB suplementado con el antibiótico apropiado se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en un volumen adecuado de la Solución I [25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM glucosa, 10 mM EDTA (pH 8.0)]. Se añadieron 2 volúmenes de la Solución II (0.1 N NaOH, 1% SDS) recién preparada y se mezcló con suavidad. A continuación se añadieron 1.5 volúmenes de la Solución III (Acetato Potásico ó Sódico 3 M pH 4.8) y se incubó en frío durante 10 minutos. Mediante centrifugación se separó

el ADN de los restos celulares. Se concentró el ADN por precipitación con 2 volúmenes de etanol y se resuspendió en un volumen adecuado de solución TE [10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)] o agua con una concentración de 20 µg/mL de RNAsa A.

III. 7. A. 1. b. Minipreparaciones de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*.

Para extraer plásmidos de células de levadura para su recuperación en *E. coli* se empleó el método de rotura de las células con perlas de vidrio de 425-600 µm (G8772, Sigma), descrito por Strathern y Higgins (1991). Se recogieron células de 1 mL de cultivo saturado y se resuspendieron en 200 µL de tampón de rotura (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) agitándolas con vórtex durante 1 minuto. Se añadieron 200 µL fenol/cloroformo/isoamílico (24:24:1) y se repitió la agitación con vórtex. A continuación las fases se separaron por centrifugación y se concentró el ADN de la fase acuosa por adsorción a una matriz de sílice (Glassmilk, Roche). Finalmente el ADN se resuspendió en un volumen final de 30 µL y se emplearon 2 µL para transformar células competentes de *E. coli*.

III. 7. A. 1. c. Minipreparaciones de ADN plasmídico de *A. tumefaciens*.

La extracción de plásmidos de *A. tumefaciens* para su recuperación en *E. coli* se realizó mediante el método de lisis alcalina anteriormente descrito añadiendo un paso de fenolización del sobrenadante antes de su precipitación con etanol. El ADN extraído se transformó en células de *E. coli* y éstas se analizaron para comprobar la integridad del plásmido.

III. 7. A. 2. Aislamiento de ADN cromosómico.

III. 7. A. 2. a. Extracción de ADN cromosómico de *S. cerevisiae*.

La preparación de ADN total de levaduras para amplificación por PCR se hizo del mismo modo que el aislamiento de plásmidos, aumentando el volumen del cultivo de partida a 10 mL. El resto de las soluciones se aumentó en la misma proporción.

III. 7. A. 2. b. Extracción de ADN cromosómico de plantas.

La preparación de a pequeña escala de ADN genómico de plantas para su análisis por PCR se realizó según se describe en Murray y Thompson (1980). El material se tritura en N₂ líquido hasta convertirlo en polvo fino y se le añaden 200 µL de tampón de extracción (0.14 M d-Sorbitol, 0.22 M Tris-HCl pH 8, 0.022 M EDTA, 0.8 M NaCl, 0.8% CTAB, 1% n-laurilsarcosina) por cada cm² de material vegetal. La mezcla se incubó a 65° C durante 5 minutos y se extrae a continuación con un volumen de cloroformo:isoamílico (24:1). La fase

acuosa se separa por centrifugación y se trata con un volumen de isopropanol, incubando la mezcla 15 minutos en hielo. Tras una nueva centrifugación el ADN se recoge en el sedimento, que se lava con etanol al 70% y se seca antes de resuspenderlo en un volumen adecuado de solución TE o agua con una concentración de 20 µg/mL de RNAsa A.

La extracción de genómico para su análisis por hibridación Southern se realizó siguiendo el mismo protocolo con algunas modificaciones. El tampón de extracción se suplementó con 400 µg/mL de proteinasa K y la incubación a 65° C se prolongó durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron dos extracciones con fenol:clorformo:isoamílico (24:24:1) seguidas de una con clorformo:isoamílico (24:1). El ADN genómico de la fase acuosa se precipitó igualmente con isopropanol y se resuspendió en agua con 20 µg/mL de RNAsa A incubando la muestra a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente la RNAsa A se eliminó de la preparación mediante una doble extracción con fenol:clorformo:isoamílico (24:24:1) y clorformo:isoamílico (24:1), concentrando finalmente el ADN mediante una precipitación con etanol-acetato de sodio (Apartado III.7.A.3.a.)

III. 7. A. 3. Precipitación del ADN.

Para concentrar el ADN en un volumen final menor de buffer TE o agua tras una restricción enzimática, una reacción de PCR, una fenolización etc. se utilizaron tres métodos distintos de precipitación.

III. 7. A. 3. a. Precipitación con Etanol-Acetato de Sodio

El ADN se precipitó añadiendo 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, e incubando la muestra a 0°C durante 10-20 minutos. Tras centrifugar durante 10 minutos a 13.000 r.p.m. se lavó el sedimento con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en un volumen apropiado de TE o agua.

III. 7. A. 3. b. Precipitación con Etanol-Acetato de Amonio

El ADN se trata con 3.5 volúmenes de una solución preparada añadiendo un volumen de una solución de acetato de amonio 7.5 M a 6 volúmenes de etanol absoluto, y se procede de igual forma que en el protocolo anterior.

III. 7. A. 3. c. Precipitación con Isopropanol

Esta precipitación se realiza de manera similar a la primera sustituyendo el etanol por un volumen de isopropanol.

III. 7. A. 4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se ha realizado según se describe en Sambrook *et al.*, 1989. El ADN procedente de digestiones con restrictasas o de reacciones de PCR se analizó en geles horizontales de agarosa (0.4-2%) preparados con tampón TBE 0.5x (45 mM Tris/borato, 1 mM EDTA) o TAE 1x (40 mM Tris/acetato, 1 mM EDTA), con 0.05 µg/mL de bromuro de etidio para teñir el ADN a la luz UV. Antes de cargarlas en el gel las muestras de ADN se trataron con tampón de carga al 5X (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol, 10 mM EDTA). La electroforesis se realizó sumergiendo el gel en el mismo tampón que se usó en su preparación, y fijando el voltaje a 1-10 V/cm hasta su completo desarrollo. El tamaño de los fragmentos de interés se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de ADN comercial (*1Kb Molecular Weight Marker X*, Roche) o con ADN del bacteriofago λ digerido con *Hind III*.

III. 7. A. 4. a. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa, la banda de interés se recortó y se purificó con el kit *PerfectPrep GelCleanup*(Eppendorf®) siguiendo las instrucciones suministradas por los fabricantes.

III. 7. A. 5. Manipulación enzimática del ADN

En general se siguieron los protocolos suministrados por Sambrook *et al.*, (1989).

III. 7. A. 5. a. Digestión del ADN con enzimas de restricción

Las digestiones con endonucleasas de restricción se hicieron usando los tampones y las condiciones recomendadas por los fabricantes. Se prepararon soluciones de ADN a una concentración ≤ 0.1 µg/µL en un volumen de 20-100 µL, añadiendo al menos 1 U de enzima por µg de ADN. La incubación se hizo en baño de agua a la temperatura indicada para cada enzima, durante al menos 1 hora.

III. 7. A. 5. b. Desfosforilación de extremos 5' de ADN.

Mediante este procedimiento se eliminan los grupos fosfatos en los extremos 5' de los plásmidos que utilizamos como vectores de clonación, con el objetivo de evitar su religación. Se añadieron 5 µL de *CIP* (1 U/µL) (Roche) directamente en el mismo buffer de restricción y se incubó a 37° C durante 10-15 min. La fosfatasa alcalina se inactivó añadiendo 4 µL de EDTA 0.5 M y 10 µL de SDS 10%, se llevó el volumen a 100 µL con agua y se realizó una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1) seguida de una precipitación con etanol-acetato sódico.

III. 7. A. 5. c. Generación de extremos romos de ADN

Este método se utiliza para permitir la posterior ligación de fragmentos de ADN generados con distintas enzimas de restricción que producen extremos incompatibles. Para hacer romos extremos 5' protuberantes de ADN se rellenó con la enzima Klenow (Sambrook *et al.*, 1989). Para los extremos 3' protuberantes se usó la ADN polimerasa del bacteriófago T4, que posee una fuerte actividad exonucleasa 3'→5' sobre el ADN monocatenario (Sambrook *et al.*, 1989).

III. 7. A. 5. d. Ligación de moléculas de ADN

Los fragmentos de ADN a ligar en sus extremos compatibles se mezclaron en una relación molar inserto:vector de 2:1 en el caso de extremos cohesivos y de 10:1 en el caso de extremos romos. La mezcla de reacción se preparó con 1U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (GE healthcare), 1X del tampón de ligación recomendado por el fabricante y los fragmentos de ADN convenientemente purificados, en un volumen total de 10-20 µL. Las ligaciones se incubaron a 16° C durante un mínimo de 5 horas y posteriormente se transformaron células competentes de *E. coli* con la mitad de la mezcla de ligación. En el caso de realizar la ligación directa de productos de PCR procedentes de una amplificación con la polimerasa *Pfu* se utilizó el sistema de clonación comercial *Zero Blunt® PCR Cloning Kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante para su clonaje en el vector pCR®Blunt II TOPO.

III. 7. A. 6. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN.

III. 7. A. 6. a. Oligonucleótidos cebadores.

Todos los cebadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados por los laboratorios Sigma-Genosys. En el anexo I se recogen las secuencias y detalles estructurales de todos los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR, RT-PCR y de secuenciación realizadas.

III. 7. A. 6. b. Amplificación con la polimerasa *TaqI*.

Para cada reacción se utilizaron ≈ 10 ng/µL de ADN molde, 0.2-0.5 µM de cada oligo, 0.2 mM dNTP (dATP+dCTP+dGTP+dTTP), 1.5 mM MgCl₂ y 0.5-1 U de *Taq I* ADN polimerasa en un volumen final de 20 ó 50 µL. En general se usaron las siguientes condiciones de reacción: 2-5 minutos a 95° C para desnaturalizar el ADN, 25 ó 30 ciclos con la secuencia: 30 segundos a 95° C, 35 segundos a 40-60° C dependiendo de la T_m de los oligos, 0.2 a 4 minutos, según el tamaño de la banda (aproximadamente 1 minuto por Kb) a 72°C para la síntesis de ADN; y finalmente 5 minutos a 72° C para la extensión final.

III. 7. A. 6. c. Amplificación con la polimerasa de alta fidelidad *Pfu*.

Para amplificar fragmentos de ADN con la finalidad de clonarlos posteriormente se ha utilizado la polimerasa de ADN *Pfu* (Promega), esto se debe a que dicha enzima polimeriza el ADN con un sistema adicional de corrección de errores por lo que la tasa de mutaciones durante la polimerización es muy baja. Para cada reacción se utilizaron 10 ng/ μ L de ADN molde, 0.2-0.5 μ M de cada oligo, 0.2 mM dNTP (dATP+dCTP+dGTP+dTTP) en 1X del tampón de reacción recomendado por el fabricante que contiene 2 mM MgSO₄ y finalmente 1-1.5 U de polimerasa *Pfu* (Promega). El programa de reacción es similar al utilizado con la Taq I con algunas variaciones. La desnaturalización inicial a 95°C no debe superar los dos minutos y el tiempo de polimerización debe prolongarse (al menos 2 minutos por Kb) pues la polimerización es más lenta.

III. 7. A. 6. d. PCR a partir de colonias de bacteria.

Se empleó principalmente en el rastreo rápido de colonias de *E. coli* o *A. tumefaciens* en una placa de cultivo. La reacción se lleva a cabo de igual manera que se describe para la polimerasa *TaqI* con la salvedad de que se sustituye el ADN por una pequeñísima porción de la colonia que se aplica sobre la pared del tubo mediante un palillo estéril. Es crucial fijar la desnaturalización inicial del ADN en 5 minutos para asegurar así una rotura eficiente del material celular con la consiguiente liberación del ADN.

III. 7. A. 6. e. Mutagénesis dirigida mediante PCR.

En este trabajo se han construido dos tipos de mutantes en la región carboxiterminal del antiportador AtSOS1, mutantes por delección y mutantes puntuales. Puesto que la región a mutar en ambos casos se situaba muy próxima al codon de parada de la proteína, el protocolo de mutagénesis empleado es el más sencillo, requiriendo una única reacción de amplificación con una pareja de cebadores, uno de ellos conteniendo las mutaciones a introducir. Para todas las amplificaciones se utilizó la polimerasa de ADN *Pfu*, según el método descrito anteriormente (Apartado III.7.A.6.c.). Esta polimerasa tiene una tasa de error muy baja debida a su capacidad de corrección de errores durante la transcripción. Esta ventaja podría resultar en una corrección de la mutación incluida en el cebador por lo que en su diseño se ha tenido la precaución de flanquear la región mutada en el extremo 3' con al menos 15 nucleótidos que hibridan completamente con la secuencia original. El producto de PCR se clonó directamente con el sistema de clonación comercial *Zero Blunt® PCR Cloning Kit* (Invitrogen).

III. 7. B. Purificación y análisis de ARN

III. 7. B. 1. Manipulación en condiciones libres de ribonucleasas.

Las ribonucleasas (RNAsas) son enzimas activos y resistentes incluso en condiciones extremas, por esta razón durante el proceso de purificación y manipulación del ARN, se trabajó con material, soluciones y reactivos debidamente tratados contra dichas enzimas. El material de vidrio, porcelana o aluminio se lavó cuidadosamente, se autoclavó y se incubó a 150-200° C durante toda la noche. El material de plástico, puntas de pipeta y tubos de polipropileno se autoclavó dos veces y las soluciones utilizadas se trataron durante 12 h con 100 mg/L del inhibidor de RNAsas dietilpircarbonato (DEPC) y posteriormente se autoclavaron. Adicionalmente se observó rigurosamente la utilización de guantes durante todos los procesos.

III. 7. B. 2. Purificación de ARN total de células vegetales.

Para la extracción de ARN total de plantas se utilizaron 2 protocolos alternativos: la precipitación diferencial con LiCl y el método del Trizol® (Invitrogen).

III. 7. B. 2. a. Precipitación diferencial con LiCl.

Se empleó para la extracción de ARN total de plantas de arroz. El material fresco (1-2 g) se congela con N₂ líquido y se pulveriza con la ayuda de un mortero. Cuando se ha reducido a un polvo muy fino se mezcla con 1 mL de buffer de extracción (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 1% SDS, 0.95 M β-mercaptoetanol) y la suspensión obtenida se trata con el mismo volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1). Tras una primera centrifugación a 13000 r.p.m. durante 10 minutos, se recupera la fase acuosa y se vuelve a repetir el tratamiento con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1). Al volumen de fase acuosa recuperado se le añade LiCl hasta una concentración final 2 M y se incuba a 4°C al menos 2 horas, precipitando así el ARN de forma selectiva. Tras centrifugar 20 min. a 13.000 r.p.m. el sedimento primero se lava con LiCl 2M y después se resuspende en acetato sódico 0.3 M a pH 5.2 y se precipita añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto e incubando a -70°C durante 20 minutos. Finalmente el sedimento se disuelve en H₂O-DEPC estéril y se congela a -80° C hasta su uso.

III. 7. B. 2. b. Método del Trizol®

La extracción de ARN total de plantas de *Arabidopsis* se ha realizado utilizando el reactivo Trizol® (Invitrogen) cuya actividad se basa en la solubilidad diferencial de las moléculas entre dos fases no miscibles: una orgánica con fenol, donde los ácidos nucleicos son insolubles, y una acuosa con tiocianato de guanidinio a pH 4.5, agente desnaturizante de

proteínas e inhibidor de RNAsas. Esta mezcla permite mantener por tanto la integridad del ARN durante todo el proceso de extracción. La extracción de ARN utilizando el reactivo Trizol® se llevo a cabo siguiendo las instrucciones y recomendaciones editadas por la casa comercial con la salvedad de que el proceso de maceración del tejido se llevo a cabo congelando el material en N₂ líquido y triturándolo con la ayuda de un embolo de plástico. Finalmente el sedimento se resuspendió en H₂O-DEPC estéril y se guardó a -80°C hasta su uso.

III. 7. B. 3. Reacciones de PCR mediadas por la Transcriptasa Reversa (RT-PCR).

A lo largo de este trabajo se ha utilizado esta técnica con dos objetivos diferenciados: la detección del transcrito exógeno en las líneas transgénicas de *Arabidopsis*, y la clonación de genes de arroz a partir de sus ARNs mensajeros. En ambos casos para la síntesis del ADNc bicatenario se empleó el mismo protocolo de RT-PCR en dos pasos. En el primero se realiza la síntesis del ADNc monocatenario utilizando un oligonucleótido con una cola de politiminas (OligodT) que se une específicamente a la cola de poliadeninas (poliA) del ARN mensajero (aproximadamente un 1% del ARN total) permitiendo su transcripción reversa por la retrotranscriptasa. En un segundo paso, a partir de la mezcla de ADNcs monocatenarios, se amplifica un fragmento determinado de ADNc bicatenario mediante una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos para el gen de interés.

III. 7. B. 3. a. Síntesis del ADNc monocatenario.

Antes de iniciar el proceso de transcripción reversa las muestras de ARN total se trataron con DNAsa I para eliminar los restos de ADN genómico contaminante. 5-10 µg de ARN total se trataron con 2µL (2U/µL) de DNAsa I (GE healthcare) en el buffer recomendado por el fabricante, y la mezcla se incubó durante 10 minutos a 37° C. Posteriormente la enzima se inactivó mediante una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1). Para la obtención de la primera cadena de ADNc se utilizaron 0.5 mM dNTPs (dATP+dCTP+dGTP+dTTP), 5 µM Oligo dT₁₂₋₁₈ y 1-5 µg de ARN total tratado con DNAsa I, en H₂O-DEPC hasta un volumen de 12 µL, incubando la mezcla a 70° C durante 5 minutos. En el mismo tubo se añadieron posteriormente 1X 1st Buffer (Invitrogen), 10 mM DTT, 1 µL de RNAGuard® 20-40 U/µL (GE healthcare) y 1 µL de M-MLV retro-transcriptasa 200 U/µL (Invitrogen), completando con H₂O-DEPC hasta un volumen final de 20 µL y la mezcla resultante se incubó a 37° C durante una hora para permitir la transcripción reversa del ARN mensajero.

III. 7. B. 3. b. Síntesis del ADNc bicatenario.

Para la detección del transcrito exógeno en las líneas transgénicas de *Arabidopsis* se utilizó la polimerasa Taq. En cambio cuando la RT-PCR se realizó con el objetivo de clonar el

fragmento de ADNc resultante, se empleó la polimerasa de alta fidelidad Pfu. En ambos casos se siguieron los protocolos que se describen anteriormente (Apartados III.7.A.6.b. y III.7.A.6.c., respectivamente) utilizando como molde 1-2 μ L de la mezcla ADNc monocatenarios obtenida previamente.

III. 7. B. 4. Electroforesis de ARN.

El análisis de ARN por electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1.25% en tampón MOPS 1X (40 mM MOPS, 10 mM acetato sódico, 1 mM EDTA, pH 7.0) y en presencia de 2.5 % de formaldehído como agente desnaturizante. Las muestras se prepararon añadiendo 5-15 μ g de ARN a cuatro volúmenes de solución de carga (50% formamida, tampón MOPS 1X, 15% formaldehído 37%, 6% glicerol 87%, 0.25% azul de bromofenol) y calentándolas 2 minutos a 95° C antes de cargarlas. La electroforesis se llevó a cabo sumergiendo el gel en tampón MOPS 1X y fijando el voltaje a 10 V/cm hasta que el colorante hubo recorrido 7-8 cm.

III. 7. C. Cuantificación de Ácidos nucleicos.

La cuantificación espectrofotométrica de la concentración y pureza del ADN y ARN se realizó utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies). Éste se basa en la tecnología de retención de muestra que permite entre otras ventajas la utilización de 1-2 μ l de muestra sin necesidad de diluirla. En el análisis de los datos, una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 50 μ g/mL si la muestra es de ADN o 40 μ g/mL si la muestra es de ARN (Berger, 1987). El cociente entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm nos da una estimación de la pureza de la preparación ya que a 280 nm absorben los aminoácidos aromáticos de posibles proteínas contaminantes. Éste debe estar comprendido entre 1.7-1.9 si se trata de ADN y entre 1.8-2.0 si es ARN. Otra estimación de la calidad de la preparación se obtuvo realizando el cociente entre las absorbancias a 260 nm y 230 nm pues la absorbancia a 230 nm es un indicativo de la contaminación de la preparación por polisacáridos y fenoles. Los valores este cociente deben ser superiores a 2 en ambos casos. La integridad de los ácidos nucleicos fue visualizada mediante una electroforesis en gel de agarosa.

III. 7. D. Hibridación de ácidos nucleicos.

III. 7. D. 1. Análisis Northern (Hibridación ADN-ARN).

Las hibridaciones ARN/ADN (Northern) se realizaron con 5-15 μ g de ARN total de plantas resuelto en gel de agarosa-formaldehído. Tras la electroforesis éste se lavó tres veces durante 15 minutos en tampón SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M citrato sódico, pH 7) 2X y posteriormente se dispuso la transferencia del ARN del gel a la membrana de nylon (HybondTM-

N, GE healthcare) mediante capilaridad en SSC 10X. Una vez finalizada la transferencia al cabo de 5-10 horas, la membrana se lavó brevemente en SSC 2X y se dejó secar completamente. La fijación del ARN a la membrana se hizo por exposición a luz UV en un horno entrecruzador *Stratalinker* (Stratagene). La membrana se pre-hibridó en solución Church (0.5 M Na₂HP0₄ pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS) durante 1-2 horas a 65° C y posteriormente se hibridó con 2-10 ng/mL de sonda radiactiva durante un mínimo de 3 horas a la misma temperatura. Finalmente la membrana se lavó una vez en SSC 2X, SDS 0.1% durante 20 minutos a temperatura ambiente y dos veces en SSC 0.2X, SDS 0.1% durante 15 minutos a 65° C, y se expuso en una película autoradiográfica durante 24-48 horas a -70 ° C usando pantallas intensificadoras. Cuando por exceso de fondo se ha requerido una mayor severidad en los lavados de membrana se han realizado dos lavado adicionales con SSC 0.1X, SDS 0.1% durante 15 minutos a 65° C.

III. 7. D. 2. Análisis Southern (Hibridación ADN-ADN).

Para hibridaciones ADN/ADN (Southern), 1-5 µg de ADN genómico de plantas se digirió con las enzimas adecuadas y se resolvió en un gel de agarosa. El gel se trató primero con solución 0.25 M HCl durante 15 minutos para fragmentar el ADN de alto peso molecular, luego con solución de desnaturalización 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH durante 20 minutos 2 veces, y finalmente con la solución de neutralización 0.5 M Tris (pH 7.4), 1.5 M NaCl, otros 20 minutos 2 veces. La transferencia e hibridación de la membrana se realizó de la misma manera que se describe para la hibridación nothern.

III. 7. D. 3. Sondas utilizadas.

La sonda radiactiva se preparó con 25-100 ng de fragmento de ADN. Para hacer el marcaje se utilizó el kit *MegaprimeTM ADN Labeling sytem* (GE healthcare) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante y los oligonucleótidos no incorporados se separaron mediante las columnas *MicroSpinTM* (GE healthcare). La sonda se desnaturalizó por calentamiento a 100°C durante 5 minutos previo a su uso.

III. 7. D. 3. a. Sonda OsSOS1.

Se preparó a partir del vector pDROsSOS1 (Apartado IV/II.2.) mediante digestión con *HindIII* y posterior aislamiento en gel de agarosa de la banda de 1,7 Kb correspondiente a la región carboxiterminal del antiportador de arroz.

III. 7. D. 3. b. Sonda 18S.

Se preparó a partir del vector pRG3 (Delcasso-Tremousaygue *et al.*, 1988) mediante digestión con *EcoRI* y posterior aislamiento en gel de agarosa de la banda de $\approx 1,6$ Kb correspondiente al fragmento de 18S del ARN ribosomal de rábano.

III. 8. Purificación y Análisis de Proteínas.

III. 8. A. Extracción de proteínas de bacterias.

Se ha empleado fundamentalmente para la purificación de proteínas recombinantes utilizando el sistema de expresión constituido por los vectores pGEX (GE healthcare), diseñados específicamente para la expresión en *E. coli* de proteínas de fusión a la enzima glutation -S-transferasa de *Schistosoma japonicum*, bajo el control del promotor químicamente inducible *tac*. Las fusiones a GST proporcionan un sistema único de purificación basado en la capacidad de esta enzima y de las fusiones a ella, para dimerizarse. El vector pGEX albergando la proteína de interés se transformó en la cepa bacteriana libre de proteasas *E. coli* BL21 y con una colonia transformante fresca se inocularon 5 mL de medio 2XYTA (16g/L triptona, 10g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl, 100 μ g/mL Ampicilina), incubando a 37° C durante toda la noche. A la mañana siguiente se inocularon 500 mL del mismo medio 2XYTA con los 5 mL de preinóculo, incubando a 37°C en agitación hasta alcanzar una $DO_{600nm} \approx 0.7$. A continuación se estimuló la síntesis de la proteína de fusión mediante la adición de 0.5 mM de IPTG, incubando a 37°C en agitación durante 4 horas más. Las células se recogen entonces por centrifugación a 7,700 X g durante 10 minutos y, tras descartar el sobrenadante, se rompen en un mortero añadiendo el triple de su peso en alúmina (AlO_3 , Sigma). La lisis celular completa se pone de manifiesto por la formación de una masa mucosa que se resuspende en 25 mL de PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.3) para transferirla posteriormente a un tubo de centrifuga apropiado. Para ayudar en la solubilización de la proteína de fusión se añadió Triton X-100 a una concentración final del 3 % y la suspensión se centrifugó a 15,000 xg durante 30 minutos a 4° C para recuperar el sobrenadante. La proteína fusión a GST se purificó desde el lisado de bacterias por cromatografía de afinidad con la resina *Glutation-Sefarose 4B* (GE healthcare) siguiendo las especificaciones técnicas de la casa comercial. Se mezcló 1 mL de la suspensión de glutation-gefarosa 4B, previamente equilibrada con 1X PBS, con 50 mL de lisado de bacterias y la suspensión se incubó en agitación suave a 4°C durante al menos 2 horas. Transcurrido este tiempo se descartó el sobrenadante y la resina, conteniendo la proteína de fusión, se empaquetó en una columna desechable (Bio-Rad), donde se lavó tres veces con 10 mL de 1X PBS frío. La elución de la proteína de fusión se llevó a cabo con 500 μ L de buffer de elución (10 mM glutation reducido, 50 mM Tris-HCl pH 8.0)

incubando 10 minutos a temperatura ambiente (22-25°C) antes de recoger el elutato. El proceso de elución se repitió dos veces más para obtener así tres fracciones con una riqueza variable en la proteína purificada. La pureza de las fracciones se monitorizó posteriormente mediante cromatografía SDS-PAGE.

III. 8. B. Extracción de proteínas de levaduras.

La preparación de extractos proteicos de levaduras se ha realizado con la finalidad de purificar proteínas recombinantes y dependiendo de su localización sub-celular se distinguen dos protocolos de extracción.

III. 8. B. 1. Purificación de proteínas de membrana.

Se ha empleado en la purificación del transportador de membrana plasmática, SOS1, mediante su expresión en la levadura con una etiqueta de histidinas (6X His). Para la preparación de fracciones enriquecidas en membrana plasmática se siguió el método descrito por Serrano (1988). Se partió de un cultivo en fase exponencial de un transformante de levadura AXT3K expresando el antiportador etiquetado. Las células, recogidas por centrifugación, se resuspendieron en el tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) y se rompieron por agitación energética con bolas de vidrio estériles de 0.5 mm de diámetro. El lisado se diluyó posteriormente con dos volúmenes de tampón GTED (20% glicerol, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2µg/mL quimostatina, 1µg/mL leupeptina) y las bolas de vidrio y restos celulares se eliminaron por centrifugación a 3.000 r.p.m. en un rotor Sorvall SS-34. El sobrenadante se centrifugó posteriormente a 16.000 r.p.m. durante 30 minutos, y el precipitado resultante, conteniendo la fracción total de proteínas membranales, se resuspendió en el tampón GTED y se guardó a -80°C. El transportador etiquetado con la cola de histidinas se purificó desde el extracto de proteínas de membrana por cromatografía de afinidad con la resina *Ni-NTA* (Qiagen) siguiendo las especificaciones técnicas de la casa comercial. Este método se basa en la interacción entre los metales de transición electropositivos, como el Ni⁺⁺ y los residuos de histidinas. 300-500 µL de extractos de membranas (8 mg/mL) se solubilizaron en 5 mL de buffer A (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 20% glicerol) con 10 mM imidazol y 0.5% dodecil-β-maltosido, a 4°C durante 30 minutos. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 20,000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se incubó a 4° C durante toda la noche con 100 µL de la resina *Ni-NTA*. A continuación la resina se empaquetó en una columna desechable (Bio-Rad) y se lavó cuatro veces con 1 mL de buffer A con 20 mM imidazol y 0.15% dodecil-β-maltosido. Finalmente la proteína se eluyó con 50 µL de buffer A con 250 mM de imidazol y 0.075% de dodecil-β-maltosido incubando 10 minutos a temperatura ambiente (22-25°C) antes de recoger el elutato. El proceso de elución se repitió tres veces más para

obtener así cuatro fracciones con una riqueza variable en la proteína purificada. La pureza de las fracciones se monitorizó posteriormente mediante cromatografía SDS-PAGE.

III. 8. B. 2. Purificación de proteínas citoplasmáticas.

Se ha realizado con la finalidad de purificar proteínas citosólicas fusionadas a GST o etiquetadas con histidinas y expresadas en la levadura. Para la obtención del lisado de levaduras se siguió el mismo protocolo que se describe en el apartado anterior, recuperando tras la centrifugación a 16.000 r.p.m. en este caso el sobrenadante, conteniendo la fracción total de proteínas citoplasmáticas. Las fusiones a GST se purificaron desde el lisado de levaduras por cromatografía de afinidad con la resina *Glutathion-Sefarose 4B* (GE healthcare) siguiendo las especificaciones técnicas de la casa comercial, tal y como se describe en el apartado III.8.A. Las proteínas etiquetadas con histidinas se purificaron desde el lisado de levaduras por cromatografía de afinidad con la resina *Ni-NTA* (Qiagen) siguiendo las especificaciones técnicas de la casa comercial, tal y como se describe en el apartado III.8.B.1.

III. 8. C. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas de los extractos se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976).

III. 8. D. Electroforesis monodimensional de proteínas.

Los extractos de proteínas, fueron analizados en minigeles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), siguiendo los protocolos suministrados por Sambrook *et al.*, (1989). Para ello se empleó una cubeta de electroforesis de proteínas (Bio-Rad) en la que se dispuso un sistema discontinuo con un gel concentrador (125mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 5% solución scrilamida 30%/bisacrilamida 0.2%, 0.05% APS y 0.1% TEMED) y un gel separador (375mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, porcentaje variable de la Solución A/B 30%/0.2%, 0.05% APS y 0.05% TEMED). Las muestras se diluyeron en tampón Laemmli 1x (125mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.1% azul de bromofenol) e inmediatamente antes de cargarlas, se hirvieron durante 3 minutos. Uno de los pocillos se reservó una mezcla de proteínas preteñidas utilizada como marcador de peso molecular (Bio-Rad). La electroforesis se realizó sumergiendo el gel en el tampón (25mM Tris, 194mM glicina y 0.1% SDS) y aplicando un voltaje constante (200V) hasta que el azul de bromofrenol alcanzara el borde del gel.

III. 8. D. 1. Tinción de proteínas.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida se detectan por tinción con azul de Coomassie. Inmediatamente después de la electroforesis, el gel se sumerge durante 30 minutos en una solución de azul de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250), al 0.05% en metanol al 50% y ácido acético al 10%. Posteriormente se destiñe en una solución que contiene metanol al 5%, y ácido acético al 7%, hasta que el fondo pierde el color azul y las bandas de proteínas adquieren nitidez.

III. 8. E. Ensayos de fosforilación *in vitro* de proteínas.

Como sustrato de fosforilación se utilizó el antiportador de arroz OsSOS1:His6X purificado por cromatografía de unión a metales (Ni^{++}) (Apartado III.8.B.1.), o fusiones a GST de fragmentos del extremo carboxiterminal del antiportador de *Arabidopsis* AtSOS1 purificados por cromatografía de afinidad (Apartado III.8.B.2.). Como protein-kinasa se empleó el mutante hiperactivo AtSOS2T/D Δ 308 fusionado a GST (GST:SOS2T/D Δ 308; Guo *et al.*, 2001) y purificado de bacterias (Apartado III.8.A.); O bien la kinasa AtSOS2 silvestre etiquetada con histidinas (AtSOS2:His6X) y purificada de levaduras (Apartado III.8.B.2.). Se mezclaron 100 ng de la kinasa con la cantidad indicada de sustrato en el buffer de fosforilación (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM DTT) y la reacción se inició añadiendo 0.2 mM ATP con 1 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1 Ci=37 GBq), ajustando el volumen final a 50 μL . La mezcla de reacción se incubó a 30° C durante 30 minutos en agitación, deteniéndola posteriormente con 15 μL de tampón de carga SDS-PAGE 4X. Finalmente se resolvieron alícuotas de 10 μL mediante electroforesis SDS-PAGE, y el gel, una vez seco, se autoradiografió.

III. 8. F. Desfosforilación *in vitro* de proteínas.

Se empleó la fosfatasa alcalina de intestino de ternero (*CIP*) para la desfosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina de proteínas purificadas mediante cromatografía de afinidad. Para ello se mezclaron 100 ng de fosfoproteína con 10 U de *CIP* (Roche) en el buffer recomendado por el fabricante y la mezcla se incubó a 37°C durante una hora en agitación. Finalmente la reacción se paró con EDTA a una concentración final de 50 mM.

III. 8. G. Purificación de vesículas de membrana plasmática de levadura.

Se ha seguido el protocolo de partición acuosa bifásica descrito por Menendez *et al.* (1995). Con una colonia de células de levadura AXT3K expresando el antiportador de interés, se inocularon 200 mL de medio AP (1 mM de K^+) conteniendo los aminoácidos de selección necesarios y el cultivo se incubó a 30°C en agitación hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 3\text{-}4$. Para asegurar la activación del antiportador por el complejo kinasa SOS2/SOS3 se adicionó NaCl

hasta una concentración final de 100 mM y se continuó la incubación durante 1 hora más, antes de recoger las células por centrifugación. A continuación las células se resuspendieron en el buffer TS (5 mM de Tris-HCl pH 7.5, 700 mM sorbitol) a una $A_{800\text{nm}}$ de 6 y se trataron con $\frac{1}{4}$ del volumen de liticasa (Sigma-Adrich) disuelta en buffer TS a razón de 300 U/mL, y 6.5 mM de DTT. La mezcla se incubó a 30° C durante 1 hora con agitación suave (≤ 100 r.p.m.) y los protoplastos resultantes se recuperaron por centrifugación a 3000 X g durante 5 minutos y se lavaron con buffer TS suplementado con 1 mM de DTT. El pellet se resuspendió en 15 mL de medio inductor de la ATP-asa (15 mM MES-Tris pH 6.5, 500 mM sorbitol, 100 mM glucosa) y se incubó a 30° C durante 10 minutos con agitación suave (≤ 100 r.p.m.). A continuación se indujo la lisis osmótica con 30 mL de un buffer compuesto por 25 mM MES-Tris pH 6.5, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2% lisado de caseína, 0.2% BSA y 1 mM PMSF, incubando la mezcla en hielo durante 5 minutos y centrifugando posteriormente (3 minutos a 300 X g) para eliminar los restos de pared celular. El sobrenadante recuperado y se centrifugó de nuevo a 35000 g durante 15 minutos a 4° C para depositar de este modo la fracción de membranas totales. El pellet resultante se resuspendió en 9 g de un tampón compuesto por 5 mM fosfato de potasio a pH 7.8, 330 mM sacarosa y 1 mM DTT y se mezcló a continuación con 27 g de una solución bifásica compuesta por 5.7% dextrano T-500 (w/w), 5.7% PEG 3350 (w/w), 5 mM fosfato de potasio pH 7.8, 330 mM sacarosa, 1mM EDTA y 1mM DTT, estabilizando la mezcla en hielo hasta la separación de las fases (30 minutos). A continuación la fase superior y la inferior (enriquecida en membrana plasmática) se recuperaron separadamente y se diluyeron con 10 volúmenes tampón de suspensión (15 mM MES-Tris pH 6.5, 330 mM sacarosa, 1 mM DTT) centrifugándolas posteriormente a 65000 x g y 4° C durante 50 minutos. Las membranas se resuspendieron en el mismo tampón de suspensión y se congelaron con N₂ líquido, almacenándolas a -80° C.

III. 8. G. 1. Pureza de la preparación de membranas.

La pureza de la preparación de membranas (fase inferior y superior) se cuantificó mediante la medida de la actividad de la ATPasa en presencia de inhibidores. El vanadato (VO_4^{3-}) es un inhibidor específico de ATPasas de tipo P, como la H⁺-ATPasa de membrana plasmática. El nitrato (NO_3^-) inhibe a las H⁺-ATPasas de tipoV, como las vacuolares y la azida (N_3^-) inhibe a las H⁺-ATPasas de tipo F0/F1, como las mitocondriales. La actividad de la ATPasa se estimó mediante la medida espectrofotométrica de la liberación de fosfato inorgánico (Webb *et al.*, 1992). Adicionalmente, para reducir el fondo de liberación de fosfato que no se deba a ATPasas se utilizó un inhibidor inespecífico de fosfatasas como el molibdato (MoO_4^{-2}). En un volumen final de 120 μL se adicionaron: 50 mM tampón MES-Tris pH 6, 330 mM sacarosa, 50 mM KNO₃, 3 mM MgSO₄, 3 mM ATP, 0.1 mM EDTA, 1mM azida sódica (N₃Na),

0.1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ y 3 a 15 μg de proteínas de membrana, y la mezcla se incubó a 30°C durante 20°C. La diferencia entre la liberación de fosfato en presencia y en ausencia de 100 μM de vanadato se consideró el valor de actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática. La solución stock de vanadato (5 mM) se preparó mezclando óxido de vanadio (V_2O_5) en una solución 20 mM de NaOH e incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 12-18 horas.

III. 8. G. 2. Ensayos de intercambio Na^+/H^+ .

La generación de un diferencial de pH entre el compartimento interno y el medio externo de las vesículas se debe a la actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática de la levadura. El intercambio Na^+/H^+ se midió por tanto como una disipación del diferencial de pH inducida por entrada de Na^+ en la vesícula con el fluoróforo sensible a pH, quinacrina (Figura 7), en la mezcla de reacción siguiente (1 mL): 5 μM quinacrina, 50 mM BTP-HCl pH 7.5, 25 mM BTP-Hepes pH 7.5, 250 mM manitol, 4 mM MgSO_4 y 50 μg de proteínas de membrana plasmática (fase inferior). La mezcla de reacción se dispuso en un espectrofotómetro de fluorescencia (Hitachi F-2500) y se equilibró en la oscuridad durante 5 minutos, antes de la primera medida de fluorescencia. El ensayo se inició añadiendo 3 mM de ATP y cuando el diferencial de pH hubo alcanzado el estado estacionario, la mezcla de reacción se suplementó con un volumen fijo de una solución de sulfato de sodio o gluconato de sodio, a una concentración variable para cada experimento. Para determinar la velocidad inicial del intercambio Na^+/H^+ , el aumento en la fluorescencia relativa se midió durante los 30 primeros segundos tras la adición de las sales de sodio. La actividad antiportadora específica se calculó dividiendo la velocidad inicial del intercambio Na^+/H^+ entre la masa de proteínas de membrana plasmática incluidas en la mezcla de reacción y el tiempo ($\Delta F \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, donde $\Delta F = F_{30} - F_0 / F_{\text{max}} - F_{\text{min}}$). Las variaciones en los valores de pH/fluorescencia se midieron en las longitudes de onda de excitación y emisión de 430 y 500 respectivamente.

III. 8. H. Espectrometría de Masas.

La espectrometría de masas es una técnica de gran aplicación en el análisis del proteoma que ha experimentado importantes mejoras durante la última década. Entre sus aplicaciones se encuentran la determinación de la masa molecular de proteínas y péptidos, la identificación de proteínas en mezclas complejas, la cuantificación de proteínas, la caracterización de la estructura tridimensional y de las modificaciones co- y post-traduccionales de las proteínas. Para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas se procede generalmente al fraccionamiento de la proteína en cuestión en péptidos discretos por una proteasa conocida (generalmente la tripsina). La mezcla proteolítica resultante es entonces fraccionada mediante cromatografía para permitir la entrada secuencial de los péptidos en el espectrómetro de masas

que, de manera resumida, produce iones gaseosos a partir de dichos péptidos para el análisis de sus masas absolutas. La espectrometría de masas está basada en el principio físico de que una partícula cargada que atraviesa un campo magnético es desviada a lo largo de una trayectoria circular en un radio que es proporcional al cociente masa/carga de la partícula en cuestión. Mediante un ajuste fino del campo electromagnético aplicado, los iones pueden ser enfocados hacia el detector que se encarga de recopilar dicha información (m/z). El conjunto de masas moleculares de la mezcla de péptidos es lo que se denomina la huella o “fingerprint” peptídica de la proteína y constituye un identificador único para cada proteína mediante su comparación *in silico* con las proteínas depositadas en las bases de datos. Adicionalmente, mediante técnicas de espectrometría de masas en tandem (MS-MS) es posible una identificación más precisa a través de la determinación de la secuencia aminoacídica de los péptidos que conforman el “fingerprint” de la proteína. La espectrometría de masas en tandem consiste en múltiples rondas consecutivas de espectrometría de masas. Así por ejemplo un péptido aislado y analizado previamente por un analizador de masas, es estabilizado en su estado iónico gaseoso mientras colisiona con un gas, ocasionando su fragmentación a través de los enlaces peptídicos en iones peptídicos de menor tamaño (DIC, disociación inducida por colisión). Un segundo analizador de masas cataloga la masa específica de los fragmentos iónicos producidos por la escisión del péptido original lo que nos da idea de la secuencia aminoacídica exacta de dicho péptido (Figura 8). Uno de los aspectos más importantes de esta identificación secuencial es la caracterización de modificaciones post-traduccionales, que pueden quedar de manifiesto por la diferencia que se observa entre la masa esperada y la obtenida experimentalmente. El correcto análisis de los espectros de fragmentación de los péptidos que contienen la modificación conduce a la determinación y localización exactas del residuo modificado.

Para el análisis espectrométrico de fosfopéptidos realizado en este trabajo se empleó la técnica de identificación nano-LC-MSMS que es un tipo de espectrometría de masas en tandem que va precedida de un proceso de aislamiento inicial de la mezcla de péptidos mediante cromatografía líquida. La proteína de interés se purificó inicialmente por cromatografía de afinidad y mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con Simply-Blue® (Invitrogen), se aisló la banda correspondiente. Ésta se recortó del gel, y tras su destinción con agua destilada, se envió al servicio de proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid) para su procesamiento e interpretación de los resultados espectrofotométricos.

III. 9. Secuenciación.

Tanto las mutaciones hechas por PCR como las construcciones preparadas a partir de fragmentos amplificados por PCR, se secuenciaron posteriormente para verificar la fidelidad de la polimerasa y comprobar su correcta transcripción. La secuenciación se llevó a cabo por el

Servicio de Secuenciación Automática de ADN del Centro de Investigaciones Biológicas-C.S.I.C.

III. 10. Herramientas Informáticas.

III. 10. A. Programas Informáticos.

Los recursos informáticos utilizados en este trabajo han sido:

- Paquete de programas *DNA Star* (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EE.UU.) para la manipulación de secuencias y construcción de alineamientos.
- Los alineamientos de secuencias aminoacídicas se realizaron con el programa CLUSTAL-X (Thompson *et al.*, 1997).
- *TREEVIEW* para la realización de arboles filogenéticos.

III. 10. B. Herramientas de Internet.

Las bases de datos más utilizadas a lo largo de este trabajo fueron:

PUBMED: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

TAIR: <http://www.arabidopsis.org>

TIGR: <http://www.tigr.org>

Como se expone en la Introducción de esta Tesis (Apartado I.8.B.), el antiportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis* SOS1 está regulado positivamente por la kinasa de *Arabidopsis* SOS2/CIPK24. La activación bioquímica del intercambio Na^+/H^+ de SOS1 mediante la fosforilación del antiportador por el complejo kinasa SOS2/SOS3 se evidencia por la dependencia del complejo SOS2/SOS3 que muestra la actividad antiportadora de SOS1 en los ensayos de expresión en la levadura halosensible AXT3K (Quintero *et al.*, 2002). Adicionalmente el complejo kinasa SOS2/SOS3 promueve la fosforilación de SOS1 en fracciones de membrana plasmática de levadura, y la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308 aislada de bacterias es capaz de fosforilar *in vitro* al antiportador SOS1 purificado. Aunque el conjunto de antecedentes experimentales apuntan a la fosforilación del antiportador como el mecanismo de activación por la kinasa (Quintero *et al.*, 2002), aún no se ha demostrado una relación directa entre fosforilación y activación, y se desconoce el dominio de reconocimiento y fosforilación por SOS2. SOS2 es una proteína-kinasa de serina y treonina con un dominio aminoterminal catalítico similar a la proteína de levadura SNF1 y a las kinasas dependientes de AMPc de animales (Liu *et al.*, 2000). La región carboxiterminal de SOS2 es en cambio única en plantas y alberga un dominio autoinhibitorio (dominio FISL/NAF) que interacciona físicamente con SOS3 y cuya delección resulta en una kinasa SOS2 constitutivamente activa e independiente de SOS3 (SOS2 Δ 308; Guo *et al.*, 2004). Además la sustitución de la treonina 168, incluida en un dominio putativo de activación por fosforilación de SOS2 por otra kinasa (todavía desconocida), por un residuo de aspartato resulta asimismo en una proteína kinasa hiperactiva. La combinación de estas dos mutaciones activantes genera una kinasa, denominada aquí SOS2T/D Δ 308, con una actividad máxima (Guo *et al.*, 2004). Basándose en la selectividad de la kinasa SOS2 por distintos péptidos sintéticos se ha establecido la siguiente secuencia consenso de reconocimiento del sitio de fosforilación: hidrofóbico-X-básico-X(2)-Ser-X(3)-hidrofóbico (Gong *et al.*, 2002c). Asumiendo que el sitio de fosforilación por SOS2 debería estar conservado en otras proteínas homólogas a SOS1 de *Arabidopsis* depositadas en las bases de datos, y teniendo en cuenta el consenso previsto para la secuencia reconocida por SOS2, la región candidata más probable se correspondería con la secuencia [1126]-DEGIVVRIDSPSKIVFRNDL-[1146] del extremo carboxiterminal del antiportador SOS1 de *Arabidopsis*. Uno de los objetivos de esta Tesis fue por tanto corroborar esta predicción teórica mediante técnicas de espectrometría de masas y, en base a los resultados espectrofotométricos obtenidos, proceder a la caracterización de mutantes puntuales en el sitio de fosforilación mediante ensayos de fosforilación *in vitro* y ensayos funcionales *in vivo* en levaduras y plantas de *Arabidopsis*.

IV/I. 1. Acotamiento preliminar del dominio de fosforilación por SOS2 mediante fosforilación *in vitro* de fragmentos carboxiterminales de SOS1.

El intercambiador Na^+/H^+ de *Arabidopsis*, AtSOS1, al igual que el resto de miembros de la familia de transportadores NhaP, presenta una región aminoterminal transmembrana seguida de una extensión carboxiterminal hidrofílica extremadamente larga (>600 residuos) y puesto que la región carboxiterminal de muchos otros transportadores ha demostrado albergar una función regulatoria (Putney *et al.*, 2002), en la búsqueda del dominio putativo de fosforilación por la kinasa AtSOS2 se ha asumido su localización carboxiterminal. No obstante, al tratarse de un segmento carboxiterminal tan prolongado, su análisis espectrofotométrico directo podría resultar bastante complejo, por lo que con objeto de simplificar su análisis posterior, se procedió al acotamiento del dominio de reconocimiento mediante la fosforilación *in vitro* de fragmentos carboxiterminales progresivamente menores del antiportador SOS1. Con dicho fin se prepararon las fusiones a GST (glutación-S-transferasa) de los fragmentos $\Delta 441-1146$, $\Delta 742-1146$, $\Delta 742-998$, $\Delta 998-1146$ y $\Delta 1073-1146$ del extremo carboxiterminal del antiportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis* (AtSOS1). Los segmentos correspondientes en el ADNc de *SOS1* se amplificaron por PCR con la polimerasa de alta fidelidad Pfu y la parejas de oligos: 5'SOS1CTBamHI-f /3'SOS1XbaI (para SOS1CT Δ 441-1146); 742BamHI-f/3'SOS1XbaI (para SOS1CT Δ 742-1146); 742 BamHI-f/998XbaI-r (para SOS1CT Δ 742-998); 998BamHI-f /3'SOS1XbaI (para SOS1CT Δ 998-1146) y 5'SOS1PLN/3'SOS1XbaI (para SOS1CT Δ 1073-1146) que añaden los sitios de restricción *BamHI* y *XbaI* en 5' y 3' respectivamente. Una vez amplificadas, las bandas se clonaron en el vector pCR[®]Blunt II TOPO y se secuenciaron al completo para descartar posibles errores en la transcripción por la polimerasa y/o en los oligos sintetizados. Los fragmentos se liberaron a continuación mediante restricción con las enzimas *BamHI* y *XbaI* y se subclonaron en los mismos sitios del vector de expresión en levaduras pEG(KT) (Mitchell *et al.*, 1993) fusionándolos así en el extremo carboxiterminal del enzima GST para su posterior purificación por cromatografía de afinidad. Las construcciones así obtenidas se expresaron posteriormente en la levadura silvestre W303 y las proteína de fusión resultantes GST:SOS1CT(441-1146), GST:SOS1CT (742-1146), GST:SOS1CT(742-998), GST:SOS1CT (998-1146) y GST:SOS1CT(1073-1146) se purificaron mediante cromatografía de afinidad a glutatión, como se describe en el apartado III.8.B.2. Para llevar a cabo la fosforilación *in vitro* se purificó de bacterias la fusión translacional de la kinasa hiperactiva GST:SOS2T/D Δ 308 vectorizada en el plásmido pGEX2TK (Guo *et al.*, 2001) y se mezcló con 100 ng de las fusiones GST:SOS1CT en el tampón de fosforilación, como se describe en el apartado III.8.E. Alícuotas de cada una de las reacciones de fosforilación, incluyendo controles sin kinasa (no se muestran) y sin sustrato, se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE y a continuación se autoradiografiaron. Como se observa en la Figura 9, el fragmento carboxiterminal mínimo

fosforilable por la kinasa SOS2T/D Δ 308 se corresponde con el segmento del antiportador SOS1 que va desde la prolina 1073 hasta el codón de parada. Así pues se seleccionó la fusión GST:SOS1CT Δ 1073-1146 para el análisis espectrofotométrico de fosfopéptidos. Adicionalmente se observó que las fusiones GST:SOS1CT Δ 998-1146 y GST:SOS1CT Δ 1073-1146 se resolvían como un doblete de bandas, tanto en presencia como en ausencia de la kinasa SOS2. Para identificar la naturaleza de dicho retraso parcial en la migración electroforética, alícuotas de la fusión GST:SOS1CT Δ 1073-1146 nativa y pretratada con fosfatasa alcalina se resolvieron paralelamente en un gel SDS-PAGE. Como se ilustra en la Figura 9, el doblete observado para la fusión GST:SOS1CT Δ 1073-1146 desaparece completamente cuando se realiza un pretratamiento de la muestra con fosfatasa alcalina (CIP). Este dato apunta a un proceso de fosforilación, ocurrido posiblemente en la levadura, y que se ha conservado parcialmente durante el proceso de purificación de la proteína, como la causa más probable de la migración electroforética heterogénea observada con estas fusiones. De hecho en la levadura utilizada para la purificación de las fusiones existen kinasas con una cierta homología con SOS2, como por ejemplo SNF1.

IV/I. 2. Análisis espectrofotométrico de la fusión GST:SOS1(1073-1146) para la identificación del(los) sitio(s) de fosforilación por SOS2.

La fusión GST:SOS1CT Δ 1073-1146, previamente identificada como el fragmento carboxiterminal mínimo fosforilable por SOS2, se purificó y se fosforiló *in vitro* por SOS2T/D Δ 308, para su identificación fosfopeptídica por espectrometría de masas. Un miligramo de fusión GST:SOS1CT Δ 1073-1146 purificada de levaduras (Apartado III.8.B.2.), se incubó en la mezcla de fosforilación con la kinasa GST:SOS2T/D Δ 308 purificada de bacterias (Guo *et al.*, 2001) como se describe en el apartado III.8.E. de esta Tesis, con la salvedad de que no se añadió [γ - 32 P]ATP. La muestra fosforilada, junto a un control no fosforilado (sin kinasa) llevado en paralelo, se resolvieron por electroforesis en un gel SDS-PAGE, tiñendo posteriormente con Simply-Blue[®] (Invitrogen), y las bandas correspondientes a la fusión GST:SOS1CT(1073-1146) se recortaron del gel y se remitieron para su identificación espectrofotométrica mediante nanoLC-MS/MS (Apartado III.8.H.). El análisis espectrofotométrico comparativo de la fusión GST:SOS1CT(1073-1146) fosforilada o no por SOS2T/D Δ 308 indicó que las serinas S1138 y S1110, incluidas en los péptidos IDSPSKIVFR y HACQLPLKGESSTR (resaltadas en negrita) respectivamente, eran posibles dianas de fosforilación por SOS2T/D Δ 308 pues aparecían fosforiladas en la muestra de GST:SOS1CT(1073-1146) incubada con la kinasa SOS2T/D Δ 308 pero no en la muestra control sin la kinasa (Figura 10). No obstante, la complejidad del análisis de las modificaciones post-traduccionales mediante espectrometría de masas hace de éste un resultado de carácter

orientativo que no pueden ser considerado en sí mismo sin ser respaldado con resultados bioquímicos. No es por tanto posible descartar la existencia de otras posibles dianas de fosforilación en la proteína cuyos péptidos fosforilados no hayan aparecido en el espectro o bien cuya fosforilación sea más lábil y no haya resistido el proceso analítico. Por otro lado la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308 y las condiciones aplicadas para la fosforilación *in vitro* no son las fisiológicas pues se pretende potenciar la reacción para obtener así el máximo de proteína fosforilada y con ello aumentar el rendimiento en la detección de las modificaciones post-traduccionales por espectrometría. Estas condiciones, pese a que favorecen los resultados del análisis, podrían ejercer un cierto grado de hiperfosforilación de la proteína y generar por consiguiente falsos positivos, es decir, residuos que aparezcan fosforilados en el análisis pero que en condiciones fisiológicas no se fosforilen. En consecuencia se procedió al examen detallado de cada una de las dianas de fosforilación encontradas mediante el estudio de su grado de conservación en los homólogos conocidos de SOS1 y de la naturaleza del dominio donde se enmarca, así como la comprobación funcional de los eventos de fosforilación detectados.

El péptido IDSPSKIVFR se localiza en un dominio del extremo carboxiterminal de SOS1 que está altamente conservado entre los homólogos de SOS1 depositados en las bases de datos (Figura 11). El alineamiento de sus secuencias aminoacídicas indica que la serina 1138 está conservada en los homólogos de SOS1 de dicotiledóneas (*Thellungiella halophita*, *Lycopersicon esculentum*, *Mesembryanthemum crystallinum*), algas (*Cymodocea nodosa*), musgos (*Psycomitrella patens*) y monocotiledóneas (*Oryza sativa*, *Triticum aestivum*). El hecho de que este residuo esté conservado en monocotiledóneas es un buen punto de partida pues, como se demuestra en el capítulo II de esta Tesis, la proteína homóloga SOS1 de arroz también se fosforila y activa por la kinasa SOS2T/D Δ 308 de *Arabidopsis*. No deja de sorprender no obstante el hecho de que la serina S1136 que se predecía como posible diana de fosforilación por SOS2, no sólo en base a la secuencia consenso de fosforilación por SOS2 (Gong *et al.*, 2002c) sino también por su alto grado de conservación en los homólogos de SOS1, no aparezca como diana de fosforilación en los resultados de espectrometría de masas. No obstante debido a la complejidad de análisis espectrofotométrico de fosfopéptidos (véase la Discusión) no sería posible descartar la posibilidad de un segundo sitio de fosforilación adicional en la serina consenso 1136.

A diferencia con el caso anterior, el péptido HACQLPLKGESSTR se localiza en una región del extremo carboxiterminal de SOS1 que no está conservada en absoluto en los homólogos conocidos de SOS1, por lo que podría tratarse de un sitio de fosforilación no fisiológico debido a la hiperfosforilación ejercida por la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308, en consecuencia no se incluyó en la caracterización molecular realizada a continuación.

IV/I. 3. Caracterización molecular y funcional de los sitios putativos de fosforilación del antiportador SOS1 por la kinasa SOS2.

IV/I. 3. A. Obtención de mutantes puntuales en los sitios putativos de fosforilación de SOS1 por la kinasa SOS2.

Los resultados obtenidos con la espectrometría de masas apuntan al dominio [1130]-VVRIDSPSKI-[1141] como posible diana de reconocimiento por SOS2T/D Δ 308, y concretamente a la serina S1138 como el sitio específico donde tiene lugar la fosforilación. Aunque dicho dominio concuerda con el consenso teórico de reconocimiento de sustratos de SOS2 (hidrofóbico-X-básico-X(2)-Ser-X(3)-hidrofóbico; Gong *et al.*, 2002c), la fosfoserina que se predice sería S1136 y no S1138. Por este motivo, por su grado de conservación en los homólogos de SOS1 y por su proximidad a la fosfoserina que indican los resultados de espectrometría de masas, se incluyó junto a la serina S1138 en los ensayos para la caracterización molecular del dominio de fosforilación. Para llevar a cabo esta caracterización se prepararon dos tipos de mutantes puntuales: mutantes no fosforilables en los que sustituyen las serinas fosforilables por residuos de alanina, y mutantes que mimetizan el estado fosforilado mediante la sustitución de las serinas fosforilables por residuos de ácido aspartato. Por un lado se mutaron ambas serinas S1136 y S1138 separadamente a residuos de alanina (mutantes SOS1-S1136A y SOS1-S1138A) con objeto de determinar, mediante ensayos de fosforilación *in vitro* y estudios de actividad *in vivo* en levaduras, cual de ellos (si no ambos) es el sitio específico donde tiene lugar la fosforilación por SOS2. Adicionalmente se preparó un mutante doble en el que se sustituyeron ambas serinas por residuos de alanina (SOS1-S1136A/S1138A). En una estrategia complementaria se preparó un mutante doble en el que se sustituyeron ambas serinas por residuos de ácido aspártico (SOS1-S1136D/S1138D). Las sustituciones de aminoácidos fosforilables (serina o treonina generalmente) por aspártico o glutámico puede en ocasiones (Hurley *et al.*, 1990), aunque no siempre (Gould *et al.*, 1991), mimetizar el estado fosforilado de una proteína. Para la obtención de los mutantes citados se amplificaron por PCR con la polimerasa de alta fidelidad (*Pfu*) y los oligos SOS1XhoI-f en 5' y SOS1A1KpnI-r, SOS1A2KpnI-r, SOS1A1-2KpnI-r o SOS1D1-2KpnI-r en el extremo 3' (Anexo I), fragmentos del extremo carboxiterminal de SOS1 correspondientes a los mutantes SOS1-S1136A, SOS1-S1138A, SOS1-S1136A/S1138A y SOS1-S1136D/S1138D respectivamente. Los fragmentos amplificados (\approx 1,4 Kb) se clonaron en el vector pCR[®]Blunt II TOPO y se secuenciaron al completo para comprobar la fidelidad de la polimerasa y sobretodo para verificar la correcta introducción de las mutaciones deseadas. Aunque no fue posible para la mutación S1136D/S1138D, al diseñar los oligos para las mutaciones S1136A, S1138A, y S1136A/S1138A se tuvo la precaución de diseñar una secuencia que, sin modificar la secuencia proteínica buscada en cada caso, modificara el patrón de restricción enzimático de cada mutante

para que así fuera posible *a priori* confirmar la presencia de cada una de estas mutaciones puntuales mediante una simple digestión enzimática, según se indica en la Tabla 4. Una vez secuenciados, los fragmentos se liberaron con las enzimas *XhoI* y *KpnI* y se ligaron en los mismos sitios del vector pSOS1-1 (Quintero *et al.*, 2002) sustituyendo el fragmento correspondiente al silvestre para obtener así las secuencias codificantes completas correspondientes a cada uno de los mutantes puntuales en el vector de expresión en levaduras pYPGE15. Las construcciones obtenidas (pSOS1-S1136A, pSOS1-S1138A, pSOS1-S1136A/S1138A, pSOS1-S1136D/S1138D) se recomprobó para confirmar de nuevo la presencia de la mutación puntual mediante digestiones diagnósticas (en el caso de los mutantes no fosforilables) o mediante una reacción de secuenciación en la región donde se localiza la mutación (en el caso del mutante SOS1-S1136D/S1138D). El plásmido pSOS1-1 (Quintero *et al.*, 2002) es un vector multicopia utilizado para la expresión en la levadura del antiportador SOS1 silvestre bajo el control del promotor *PGK1*, por lo que las construcciones obtenidas fueron además de especial utilidad en la caracterización *in vivo* de los mutantes mediante su expresión heteróloga en *S. cerevisiae*, como se describe a continuación.

IV/I. 3. B. Ensayos de fosforilación *in vitro* de los mutantes puntuales de fosforilación.

Con objeto de ensayar la capacidad de los mutantes puntuales SOS1S1136A, SOS1S1138A y SOS1S1136A/S1138A para ser fosforilados *in vitro* por la kinasa hiperactiva SOS2T/DΔ308, se prepararon fusiones a GST (glutación-S-transferasa) de los fragmentos carboxiterminales SOS1CTΔ441-1146 del antiportador de *Arabidopsis* (AtSOS1) albergando las mutaciones puntuales SOS1S1136A, SOS1S1138A y SOS1S1136A/S1138A. Dichos fragmentos se amplificaron por PCR a partir de los vectores pSOS1-S1136A, pSOS1-S1138A y pSOS1-S1136A/S1138A, utilizando la polimerasa de alta fidelidad *Pfu* y los oligos 5'SOS1CTBamHI-f /3'SOS1XbaI (Anexo I) que le añaden los sitios de restricción *BamHI* y *XbaI*, en 5' y 3' respectivamente. Una vez amplificadas, las bandas se clonaron en el vector pCR®Blunt II TOPO y se secuenciaron al completo para descartar posibles errores en la transcripción por la polimerasa y/o en los oligos sintetizados. Los fragmentos se liberaron a continuación mediante restricción con las enzimas *BamHI* y *XbaI* y se subclonaron en los mismos sitios del vector de expresión en levaduras pEG(KT) (Mitchell *et al.*, 1993) fusionándolos así en el extremo carboxiterminal del enzima GST para su posterior purificación por cromatografía de afinidad. Estas construcciones se expresaron posteriormente en la levadura silvestre W303 y las proteína de fusión sintetizadas, GST:SOS1CT(441-1146) silvestre y mutantes SOS1S1136A, SOS1S1138A y SOS1S1136A/S1138A, se aislaron mediante cromatografía de afinidad a glutatión, tal y como se describe en el apartado III.8.B.2. Para llevar a cabo los ensayos de fosforilación *in vitro* se purificó de bacterias la fusión translacional de la

kinasa hiperactiva GST:SOS2T/D Δ 308 vectorizada en el plásmido pGEX2TK (Guo *et al.*, 2001) y se mezcló con 100 ng de las fusiones GST:SOS1CT(441-1146) en el tampón de fosforilación, como se describe en el apartado III.8.E. Alícuotas de cada una de las reacciones de fosforilación, incluyendo controles sin kinasa y sin sustrato, se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE y a continuación se autoradiografiaron. Como se observa en la Figura 12, tan sólo la fusión que porta el extremo carboxiterminal silvestre es sustrato de fosforilación por SOS2, quedando tanto los mutantes puntuales parciales S1136A y S1138A, como el doble mutante puntual S1136A/S1138A inalterados. Este resultado no sólo revela la importancia de las serinas S1136A y S1138A en el dominio carboxiterminal [1130]-VVRIDSPSKI-[1141] del antiportador, como únicas dianas de fosforilación por SOS2, sino que además, y puesto que ambos mutantes puntuales, SOS1-S1136A y SOS1-S1138A, aún conservando una de las dianas de fosforilación no resultan fosforilados, pone de manifiesto la necesidad de una secuencia inalterada para su reconocimiento y fosforilación por la kinasa SOS2.

IV/I. 3. C. Caracterización funcional heteróloga en *S. cerevisiae* de los mutantes puntuales de fosforilación.

El sistema de expresión en la levadura ha sido utilizado extensamente para el aislamiento y caracterización funcional de proteínas individuales de varios organismos y especialmente en el estudio de proteínas de transporte de plantas (Dreyer *et al.*, 1999). Ciertamente ha sido de especial utilidad en el estudio de la regulación del sistema SOS (Quintero *et al.*, 2002) donde la coexpresión de las proteínas SOS ha permitido demostrar distintos aspectos de la regulación de SOS1 por el complejo SOS2/SOS3. Para los ensayos de actividad de los alelos mutados de SOS1 se empleó la cepa de *S. cerevisiae* AXT3K (Δ ena1-4 Δ nha1 Δ nhx1) que carece de los transportadores de Na⁺ esenciales para su tolerancia salina y por lo tanto es incapaz de crecer en medios con un contenido de Na⁺ igual o superior a 70 mM (en medio AP con 1 mM de K⁺). Las ATPasas de Na⁺ ScENA1-4 y el antiportador Na⁺,K⁺/H⁺ ScNHA1 se localizan en la membrana plasmática y ambos median en la extrusión de Na⁺ del citosol (Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995; Bañuelos *et al.*, 1998). En cambio, el antiportador Na⁺/H⁺ ScNHX1 está implicado en la compartimentación endosomal de Na⁺ (Nass *et al.*, 1997; Darley *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2000). La expresión en esta cepa de un transportador de Na⁺ de membrana plasmática como es SOS1 es capaz por sí sola de suprimir parcialmente dicho fenotipo permitiendo un crecimiento en medio AP por encima de 70 mM de Na⁺. La fosforilación del antiportador silvestre SOS1 por la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308 promueve su actividad transportadora de Na⁺ procurando a la levadura con un mecanismo de extrusión del ión tóxico que alivia su fenotipo de halosensibilidad permitiéndole crecer en medio AP con concentraciones superiores a 200 mM de Na⁺ (en 1 mM de K⁺). Así pues el

estudio detallado de la halosensibilidad de los transformantes de levadura con los putativos mutantes del sitio de fosforilación en presencia o ausencia de la kinasa SOS2T/D Δ 308 es indicativo de la capacidad de activación de SOS1 por fosforilación y por tanto da idea de la contribución individual de cada una de las fosfoserinas objeto de estudio (S1136 y S1138) en dicho proceso.

Las construcciones con los mutantes puntuales no fosforilables (pSOS1-S1136A, pSOS1-S1138A y pSOS1-S1136A/S1138A) se coexpresaron en la cepa de levadura AXT3K junto a la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308 vectorizada en el plásmido monocopia p414GPD y, mediante ensayos por goteo en placas de medio AP 1mM K⁺ suplementado con distintas concentraciones de NaCl, se determinó la tolerancia salina de los transformantes. Como se observa en la Figura 13, en ausencia de la kinasa la expresión de los tres mutantes en residuos fosforilables de serina (SOS1-S1136A, SOS1-S1138A, SOS1-S1136A/S1138A) suprime parcialmente el fenotipo de halosensibilidad de las células de levadura pero sólo hasta el nivel alcanzado por el antiportador silvestre, permitiendo el crecimiento en medio AP con hasta 70 mM Na⁺ (en 1 mM de K⁺). En cambio la coexpresión de la kinasa SOS2T/D Δ 308 es incapaz de activar ni a los mutantes parciales SOS1-S1136A y SOS1-S1138A, ni al doble mutante SOS1-S1136A/S1138A (Figura 13) por lo que la halotolerancia de los transformantes se mantiene casi al nivel de actividad basal alcanzada en ausencia de la kinasa (AP 1mM K⁺/70 mM Na⁺). Este resultado revela la importancia de ambas serinas S1136A y S1138A en el dominio carboxiterminal [1130]-VVRIDSPSKI-[1141] de SOS1 para alcanzar su máxima activación por SOS2, y puesto que los mutantes puntuales parciales (SOS1-S1136A y SOS1-S1138A), aún conservando una de las dianas de fosforilación no se activan ni fosforilan por SOS2, pone de manifiesto la necesidad de una secuencia inalterada para el reconocimiento, fosforilación y posterior activación del antiportador SOS1 por la kinasa. Para confirmar este modelo, la construcción pSOS1-S1136D/S1138D, en la que se pretendía mimetizar el estado fosforilado de SOS1, se expresó en la cepa AXT3K y se determinó la halotolerancia del transformante en relación al transportador silvestre, en ausencia y en presencia de la kinasa (Figura 14). Como se argumenta en el apartado anterior, la sustitución de los residuos fosforilables de serina, S1136 y S1138, por residuos de ácido aspártico se realiza con la finalidad de mimetizar su estado fosforilado y por lo tanto de la doble mutación S1136D/S1138D se esperaba obtener un transportador constitutivamente activo y cuya actividad fuera independiente de la kinasa. Como se observa en la Figura 14 los resultados no concordaron con lo esperado pues el mutante SOS1-S1136D/S1138D fue incapaz de suprimir el fenotipo de halosensibilidad de la cepa de levadura más allá de la complementación que se alcanza con la actividad basal de SOS1 en ausencia de la kinasa SOS2T/D Δ 308. Este resultado, aunque en desacuerdo con los resultados obtenidos para el mutante no fosforilable SOS1-S1136A/S1138A, debe ser considerado con

precaución pues el mimetismo fosfoserina-aspartato, por razones difíciles de determinar en cada caso, no siempre genera los efectos esperados (Gould *et al.*, 1991).

IV/I. 3. D. Caracterización funcional homóloga en *A. thaliana* del mutante puntual de fosforilación SOS1-S1136A/S1138A.

El sistema de expresión heteróloga en la levadura ha sido de gran utilidad en el ensayo de la actividad *in vivo* de los distintos mutantes puntuales debido a la sencillez del proceso de transformación y de la realización de los ensayos de halotolerancia. No obstante este sistema proporciona un resultado provisional pues los componentes celulares de la levadura pueden diferir sustancialmente de los de la célula vegetal y a menudo las actividades observadas pueden ser una consecuencia del entorno del sistema heterólogo y no ser directamente extrapolables a la célula vegetal. Por este motivo se hizo necesaria la confirmación de los resultados obtenidos en la levadura mediante ensayos *in vivo* en plantas de *Arabidopsis*. El mutante *sos1-1* de *Arabidopsis* contiene una delección de 14 pb en la región codificante de *SOS1* que anula completamente la funcionalidad del transportador y pone de manifiesto un fenotipo de halosensibilidad severa que imposibilita su crecimiento en presencia de un estrés salino moderado (hasta 50 mM NaCl en medio MS) (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002). La expresión del antiportador SOS1 silvestre en plantas mutantes *sos1-1* es capaz de aliviar el fenotipo de halosensibilidad de los transformantes (Shi *et al.*, 2000). Así pues, con objeto de confirmar la capacidad del transportador mutante SOS1-S1136A/S1138A para fosforilarse y activarse *in vivo* por el complejo SOS2/SOS3 se transformaron plantas de *Arabidopsis sos1-1* con el doble mutante no fosforilable y se llevaron a cabo ensayos para determinar la capacidad del transportador para suprimir el fenotipo de halosensibilidad de los transformantes. Con dicho fin se preparó una construcción para expresar en plantas el antiportador mutante SOS1-S1136A/S1138A bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S*, en el vector binario pBI321. Para ello se amplificó por PCR con la polimerasa *Pfu* y los oligonucleótidos SOS1XhoI-F y SOSCTSacI-R (Anexo I), un fragmento (\approx 1,4 Kb) del extremo carboxiterminal del mutante y se clonó posteriormente en el vector pCR[®]Blunt II TOPO. Una vez secuenciado se liberó con las enzimas *XhoI* y *SacI* y se sustituyó el mismo fragmento en el gen *SOS1* silvestre del vector binario de expresión pBIAtSOS1 (Shi *et al.*, 2000). El vector con el inserto mutado, pBIAtSOS1-S1136A/S1138A se diferenció del vector original pBIAtSOS1 mediante una digestión *Clal*, que en el caso de tratarse del vector original con el antiportador silvestre liberaba una banda de \approx 800 pb pero que estaba ausente en presencia del vector pBIAtSOS1-S1136A/S1138A (véase Tabla 4). Adicionalmente, para reconfirmar la presencia de la mutación en la construcción obtenida, se secuenció en la región mutada. La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 se transformó con las construcciones pBIAtSOS1-S1136A/S1138A,

además de pBIAtSOS1 (Shi *et al.*, 2002) y vector vacío pBI321 como controles positivo y negativo respectivamente. Plantas de *Arabidopsis* portando la mutación *sos1-1* se agroinfectaron con las bacterias transformadas y las semillas resultantes se seleccionaron para obtener líneas transgénicas (T1) que expresaban las proteínas SOS1-S1136A/S1138A, SOS1 silvestre, o un control con el vector vacío. Se seleccionaron 8 líneas en las que presencia del transgén *SOS1-S1136A/S1138A* se confirmó mediante la amplificación por PCR, a partir de DNA genómico de estas líneas, de un fragmento de ≈ 500 pb con oligos específicos del transgén (998BamHI-F y NOSTerm-R). Posteriormente dicho fragmento se purificó y se secuenció con el oligo 5'SOS1PLN para confirmar la presencia de la mutación puntual. Adicionalmente el fondo genético *sos1-1* se confirmó mediante diagnóstico por PCR de la delección de 14 pb que define al alelo mutante (Shi *et al.*, 2000), como se describe en el apartado III.6.B.1. Los ensayos de halotolerancia se realizaron mediante transferencia de plántulas transgénicas de generación T2, previamente seleccionadas en kanamicina, a medios suplementado con 0, 50 y 100 mM de NaCl. De las 8 líneas transgénicas ensayadas expresando la proteína SOS1-S1136A/S1138A, todas resultaron capaces de suprimir levemente el fenotipo del mutante observándose un cierto crecimiento en medio MS con 50 mM de NaCl, ausente en los transformantes con vector vacío. Sin embargo, dicha supresión fenotípica fue solamente parcial pues el crecimiento de las líneas congénicas transformadas con el ADNc de *AtSOS1* silvestre bajo el mismo promotor fue muy superior comparado con el de aquellas que expresaban el antiportador mutado SOS1-S1136A/S1138A, tanto en presencia como en ausencia de sal (Figura 15). La complementación parcial observada puede explicarse en base a la actividad transportadora basal de la proteína mutante SOS1-S1136A/S1138A, pero que al carecer de los sitios de fosforilación S1136 y S1138, es incapaz de fosforilarse y activarse *in vivo* por la kinasa SOS2 y por lo tanto no alcanza los niveles de actividad del transportador silvestre, siendo por tanto incapaz de suprimir completamente el fenotipo del mutante *sos1-1*.

Con objeto de determinar si el nivel de complementación observado en las plantas transgénicas *sos1-1* transformadas con SOS1-S1136A/S1138A es atribuible a la actividad basal del antiportador SOS1-S1136A/S1138A, se cuantificó el nivel de halotolerancia de tres líneas transgénicas *sos1-1* expresando SOS1-S1136A/S1138A, en relación a la halotolerancia del mutante *sos2-2*, el silvestre (*Col 0 gll*) y una línea transgénica mutante *sos1-1* expresando el alelo silvestre del antiportador SOS1 bajo el control del mismo promotor *CaMV35S*. Puesto que el mutante *sos2-2* presenta una versión silvestre del antiportador SOS1 pero carece de un alelo funcional de la kinasa SOS2, su nivel de halotolerancia se correspondería con el conferido por un SOS1 en condiciones basales, sin ser activado por SOS2. Como se observa en la Figura 16, el nivel de halotolerancia de las plantas transgénicas *sos1-1* transformadas con SOS1-S1136A/S1138A, expresado como la elongación de la raíz primaria tras 10 días de crecimiento

en medio MS suplementado con 50 mM de NaCl, es de una magnitud similar al del mutante *sos2-2*. Este resultado apunta a la fosforilación de la serina S1138 en el dominio [1126]-DEGIVVRIDSPSKIIVFRNDL-[1146] como el principal mecanismo de activación del antiportador de *Arabidopsis* SOS1 por el complejo kinasa SOS2/SOS3.

El sistema SOS de tolerancia salina en plantas se ha descrito y caracterizado en la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana*, pero cada vez es mayor el número de genes homólogos putativos del antiportador AtSOS1 de otras especies vegetales (*Cymodocea nodosa*, *Phycomitrella patens*, *Lycopersicon esculentum*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*) que son depositados en la base de datos. Aprovechando la reciente secuenciación genómica de la monocotiledónea *Oryza sativa*, uno de los objetivos de esta tesis fue la identificación y caracterización molecular de los homólogos funcionales de arroz de cada una de las tres proteínas del sistema SOS (SOS1, SOS2 y SOS3) de *Arabidopsis*. El grado de equivalencia funcional entre los homólogos SOS de arroz y *Arabidopsis* se determinó mediante ensayos de fosforilación *in vitro* y estudios de actividad *in vivo* en levaduras y plantas de *Arabidopsis*.

IV/II. 1. Clonación del antiportador de arroz OsSOS1 y análisis de su secuencia.

Tomando *Oryza sativa* como modelo genético, se realizó una búsqueda computarizada de homólogos del antiportador de *Arabidopsis* SOS1 en las bases de datos disponibles. El resultado de la búsqueda fue un único clon EST de arroz (*Oryza sativa* subsp. *japonica* cv *Nipponbare*; Entrada C71771) de 290 pb cuya secuencia codificaba un putativo homólogo del antiportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis* SOS1. Dicho clon EST se solicitó al MAFF DNA Bank en Japón y una vez recibido se secuenció por completo. El análisis comparativo de la secuencia codificada por el ADNc de arroz con aquella del antiportador de *Arabidopsis* indicó que se trataba de la proteína completa de un homólogo de AtSOS1 en arroz (Figura 17). No obstante la fase de lectura parecía estar interrumpida por dos intrones no procesados. Para confirmar esta posibilidad se amplió el alineamiento de secuencias para incluir a homólogos adicionales de SOS1 provenientes de otras especies. Las secuencias de SOS1 del musgo *Phycomitrella patens*, del alga *Cymodocea nodosa*, de la dicotiledónea *Lycopersicon esculentum* y de la monocotiledónea *Triticum aestivum* se recuperaron de la base de datos con las entradas CAD91921, CAD20320, CAG30524 y AAQ91618 respectivamente. Las secuencias de las proteínas SOS1 de las especies halofitas *Thellungiella halophila* y *Mesembryanthemum crystallinum* fueron cedidas por los Dres. Valery Poroyko y Hans Bohnert, de la Universidad de Illinois. El alineamiento múltiple de las secuencias de todos los polipéptidos evidenció un alto grado de colinealidad entre los distintos homólogos de SOS1 y confirmó la presencia de dos secuencias de nucleótidos interferentes de 805 y 160 pares de bases en el clon de arroz, concretamente en las posiciones de nucleótidos +750 y +970 respectivamente, tomando como referencia de codon de inicio del ADNc correctamente procesado. La conclusión de que dichas secuencias interferentes fueran intrones no procesados se vió reforzada por el análisis de la secuencia genómica de arroz en el locus correspondiente, en la que dichas secuencias estaban presentes y flanqueadas secuencias consenso para el procesamiento de intrones (resultados no mostrados). Para obtener un ADNc correctamente procesado que pudiera ser utilizado en los

ensayos funcionales en células de levadura se utilizó RNA de arroz (*Oryza sativa* subsp. *japonica* cv *Nipponbare*) como molde para la amplificación mediante RT-PCR con los oligos RSOS1A y RSOS1B (Anexo I) de un fragmento de ADNc correspondiente a los nucleótidos +1 a +2432 en la región codificante de OsSOS1, abarcando por tanto la región conflictiva del clon EST de arroz. Dicho fragmento se clonó en el vector pCR[®]Blunt IITOPPO (Invitrogen) y se secuenció al completo para confirmar la eliminación de ambos intrones y la fidelidad de la polimerasa, y posteriormente se subclonó en el clon EST original como un fragmento Sall-BamHI, sustituyendo de este modo el fragmento equivalente, portador de las secuencias interferentes. Así se obtuvo una secuencia ininterrumpida de ADNc que codificaba una proteína completa de 1148 aminoácidos con un 59.2 % de identidad con el antiportador Na⁺/H⁺ de *Arabidopsis* SOS1 (Figura 17). Dicha secuencia de ADNc se depositó en los bancos públicos con el código AY785147. Mediante alineamiento por homología con las secuencias genómicas de *Oryza sativa* de las subespecies *índica* y *japónica* disponibles en las bases de datos se encontró que el ADNc aislado (en adelante *OsSOS1*) correspondía al locus Os12g44360 en el cromosoma XII y que no existían otras secuencias de homología significativa. Por lo tanto se concluye que al igual que en *Arabidopsis*, *SOS1* es un gen de copia única en arroz.

IV/II. 2. Caracterización funcional heteróloga en *S. cerevisiae* del antiportador de arroz OsSOS1.

Para ensayar la actividad transportadora de OsSOS1 *in vivo* se empleó el sistema de expresión heteróloga en *S. cerevisiae*. Para ello mediante la inserción del ADNc de arroz como un fragmento Sall-NotI de 3,7 Kb en los sitios XhoI-NotI del vector multicopia pDR195 (Rentsch *et al.*, 1995) se obtuvo una construcción (pDROsSOS1) que permitía la expresión en la levadura del antiportador *OsSOS1*. Para los ensayos de actividad se seleccionó la cepa de *S. cerevisiae* AXT3K ($\Delta ena1-4 \Delta nha1 \Delta nhx1$) que carece de los transportadores de Na⁺ esenciales para su tolerancia salina y por lo tanto es incapaz de crecer en medio AP con concentraciones de Na⁺ superiores a 70 mM (en 1 mM de K⁺) (Quintero *et al.*, 2002, 2000). Se transformó dicha cepa de levadura con la construcción pDROsSOS1 y con el vector vacío pDR195 y se realizaron ensayos por goteo de diluciones seriadas para determinar la tolerancia salina de los transformantes. Como se observa en la Figura 18 la expresión de *OsSOS1* bajo el control del promotor *PMA1* (pDROsSOS1) recupera parcialmente la halotolerancia de la levadura observándose crecimiento celular en medio AP con hasta 100 mM de Na⁺ (1 mM K⁺). Este resultado indica que *OsSOS1* expresado de manera heteróloga en la levadura AXT3K actúa como un transportador de Na⁺ reduciendo sus niveles citosólicos y con ello la toxicidad, permitiendo así el crecimiento en medios con concentraciones superiores de sal. El antiportador de *Arabidopsis* AtSOS1 ha demostrado ser sustrato de fosforilación por el complejo kinasa SOS2/SOS3 de *Arabidopsis*, lo que además potencia su actividad transportadora de Na⁺ (Qiu *et*

al., 2002; Quintero *et al.*, 2002; capítulo I de esta Tesis). Para ensayar la capacidad del homólogo de arroz OsSOS1 de ser activado por el complejo kinasa SOS2/SOS3 de *Arabidopsis* se utilizó el mismo sistema de expresión heteróloga en la levadura AXT3K añadiendo en este caso la expresión de las proteínas de *Arabidopsis* SOS2 y SOS3. La kinasa SOS2 se expresó bajo el control del promotor del gen *ADHI* de *S. cerevisiae* y para SOS3 se empleó el promotor del gen *PMA1* en los vectores monocopia pFL2T, pFL3T respectivamente, y pFL32T para la coexpresión de SOS2, SOS3 o ambos, respectivamente (Quintero *et al.* 2002). Nuevamente se transformó la levadura AXT3K con los vectores para la coexpresión de las tres proteínas SOS (OsSOS1, AtSOS2 y AtSOS3) junto a los vectores vacíos correspondientes y se determinó la tolerancia salina de los distintos transformantes mediante ensayos por goteo de diluciones seriadas. Como se muestra en la Figura 18 la coexpresión del antiportador de arroz junto al complejo kinasa de *Arabidopsis* SOS2/SOS3 aumentó dramáticamente la halotolerancia de los transformantes permitiendo su crecimiento en medio AP con hasta 400 mM de NaCl, que es la concentración máxima tolerada por la cepa de levadura silvestre (W303). Esta tolerancia incrementada se observó únicamente en presencia de OsSOS1, descartando la posibilidad de que SOS2 o SOS3 estuvieran estimulando alguna actividad endógena de la levadura. AtSOS2 en presencia de OsSOS1 fue capaz de potenciar la halotolerancia de la levadura hasta un nivel intermedio, inferior al alcanzado cuando se coexpresaron las tres proteínas SOS, pero considerablemente superior al conferido por OsSOS1 solo. Esta activación parcial de OsSOS1 se debe posiblemente a una actividad basal de AtSOS2 en ausencia de AtSOS3. Este resultado indica que, al igual que AtSOS1, el antiportador de arroz OsSOS1 podría precisar de alguna proteína moduladora para desarrollar su máxima actividad transportadora de Na⁺ y que dicha proteína moduladora posiblemente pertenezca a la familia de las proteínas quinasas CIPKs.

IV/II. 2. A. Cuantificación del sodio intracelular en transformantes OsSOS1 de levadura.

Para determinar el mecanismo por el cual OsSOS1 incrementa la tolerancia salina de la levadura AXT3K, se midió el contenido intracelular de Na⁺ en transformantes que expresaban varias combinaciones de los genes SOS (OsSOS1, AtSOS2 y AtSOS3). Cuando se crecieron en medio AP suplementado con 30 mM NaCl (1 mM KCl) las células expresando sólo OsSOS1 mantuvieron unos niveles intracelulares de Na⁺ considerablemente inferiores a las células control transformadas con el vector vacío (Figura 18). Sin embargo la coexpresión del antiportador de arroz junto al complejo SOS2/SOS3 de *Arabidopsis* redujo el contenido de Na⁺ intracelular hasta unos niveles muy inferiores a los de células expresando OsSOS1 sola o junto con la kinasa AtSOS2. Puesto que el contenido intracelular de Na⁺ engloba tanto al citosólico como al endosomal, la reducción en los niveles intracelulares de Na⁺ descarta la posibilidad de que el mecanismo de tolerancia se deba a la compartimentación del Na⁺ citosólico. Por lo tanto se puede concluir que OsSOS1 aumenta la tolerancia salina de la levadura mediante una

extrusión del exceso de Na^+ citosólico y que dicho transporte de Na^+ se ve potenciado por el complejo kinasa SOS2/SOS3 de *Arabidopsis*.

IV/II. 3. Cuantificación del intercambio Na^+/H^+ catalizado por OsSOS1 en vesículas de membrana plasmática de levadura.

Para demostrar de manera directa la actividad antiportadora de OsSOS1 se purificaron vesículas de membrana plasmática de levaduras de la estirpe AXT3K expresando OsSOS1 en presencia y en ausencia del complejo kinasa SOS2/SOS3 de *Arabidopsis*. Las células de levadura crecidas en medio selectivo AP (1mM KCl) se transfirieron al mismo medio suplementado con 100 mM de NaCl durante una hora para permitir la activación del complejo kinasa SOS2/SOS3 y a continuación se purificaron vesículas de membrana plasmática. Se comprobó la pureza de la preparación de vesículas mediante la medida de la hidrólisis de ATP en presencia de inhibidores de ATPasas mitocondriales (azida), vacuolares (nitrito) y plasmáticas (vanadato) (Apartado III.8.G.1.). La sensibilidad relativa de la actividad ATPasa total a dichos inhibidores confirmó que la preparación de vesículas estaba enriquecida en membrana plasmática (Figura 19). El intercambio Na^+/H^+ se monitorizó mediante la medida de la fluorescencia en presencia de quinacrina, un fluoróforo liposoluble sensible a pH. El interior de las vesículas se acidifica rápidamente tras la adición de ATP, estableciéndose un gradiente de pH que alcanza el estado estacionario cuando se igualan la fuga y el transporte de protones a través de la membrana de la vesícula. La disminución del pH en el lumen vesicular produce una disminución de la fluorescencia debida a la quinacrina (véase Figura 7). La adición de una sal de sodio (Na_2SO_4) originó una recuperación de la fluorescencia, es decir, una disipación del gradiente de pH, poniendo de manifiesto una actividad antiportadora Na^+/H^+ en las vesículas. Para confirmar que la disipación observada en el gradiente de pH es un efecto de la presencia de cationes sodio y no del anión acompañante, se llevaron a cabo ensayos de transporte sustituyendo el sulfato disódico por gluconato sódico, encontrándose unas actividades antiportadoras relativas proporcionalmente similares, independientemente de la sal sódica empleada. Puesto que el gluconato, al contrario que el sulfato, es un anión impermeable, se concluyó que la disipación del pH era específica del catión sodio (Figura 20). Dentro del rango de concentraciones de Na^+ de 25 a 100 mM (12.5-50 mM Na_2SO_4) la actividad antiportadora Na^+/H^+ resultó ser superior en vesículas aisladas de transformantes de levadura que expresaban OsSOS1 en comparación con la actividad de fondo observada en vesículas control carentes de transportadores específicos (Figura 20). La máxima actividad intercambiadora Na^+/H^+ se observó en las vesículas procedentes de células que coexpresaban las tres proteínas SOS, resultado que se explica por la activación del antiportador de arroz OsSOS1 por el complejo kinasa SOS2/ SOS3 de *Arabidopsis*. Estas diferencias en el intercambio Na^+/H^+ de los distintos transformantes de levadura, en concordancia con sus halotolerancias y sus contenidos

intracelulares de Na^+ , confirman que el homólogo de arroz *OsSOS1* actúa, al menos en la levadura, como un antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática y que su actividad se potencia por el complejo kinasa SOS2/SOS3 de *Arabidopsis*.

IV/II. 4. Ensayo de fosforilación *in vitro* de OsSOS1 por la kinasa de *Arabidopsis* AtSOS2.

En estudios previos se ha demostrado que el antiportador Na^+/H^+ SOS1 de *Arabidopsis* es sustrato de fosforilación por el complejo kinasa SOS2/SOS3 (Quintero *et al.*, 2002; capítulo I de esta Tesis). Los resultados presentados en las Figuras 18 y 20 demuestran que la actividad antiportadora de OsSOS1 también se potencia por la coexpresión del complejo proteín kinasa de *Arabidopsis*. Para confirmar que dicha potenciación de la actividad cursa mediante la fosforilación del antiportador de arroz por AtSOS2 se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* a partir de las proteínas purificadas. Para ello mediante PCR con la polimerasa *Pfu* y los oligos OsBglII-f y OsSOS1His6X-r se amplificó un fragmento del extremo carboxiterminal de OsSOS1 etiquetado con una cola de histidinas (6XHis). Dicho fragmento se clonó en el vector pCR[®]Blunt II TOPO (Invitrogen) y se secuenció al completo para confirmar la fidelidad de la polimerasa, y posteriormente se subclonó en el vector original pDROsSOS1 como un fragmento BglIII-NotI, sustituyendo el fragmento equivalente no etiquetado. El vector así obtenido se expresó en la levadura silvestre W303 y la proteína completa OsSOS1His6X, etiquetada con la cola de histidinas, se purificó, desde el extracto de proteínas de membrana, mediante cromatografía de unión a resina de Ni^{++} . Para la reacción de fosforilación *in vitro* se empleó la kinasa de *Arabidopsis* silvestre (AtSOS2) y mutante AtSOS2T/D Δ 308, purificadas de levaduras o bacterias respectivamente (Apartados III.8.A. y III.8.B.2.). La reacción de fosforilación llevó a cabo mezclando 100 ng del antiportador de arroz purificado OsSOS1:His6X con 100 ng de la fusión transnacional GST:SOS2T/D Δ 308 en la mezcla de reacción de fosforilación, tal y como se describe el apartado III.8.E. Como se observa en la Figura 21, la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308 cataliza una intensa fosforilación de OsSOS1, el alelo silvestre en cambio, y como consecuencia de su actividad autoinhibitoria en ausencia de SOS3, procura una fosforilación más débil. De conformidad los resultados anteriores (Figuras 18 y 20) este dato ratifica al antiportador de arroz OsSOS1 como sustrato de fosforilación por la kinasa de *Arabidopsis* AtSOS2.

IV/II. 5. Complementación de mutantes *sos1-1* de *Arabidopsis* por el homólogo de arroz OsSOS1.

En *Arabidopsis*, SOS1 desempeña dos importantes funciones implicadas en la tolerancia salina de la planta, como son la restricción de la entrada neta de Na^+ en la raíz y el control de la carga de Na^+ en el xilema para su transporte a larga distancia (Shi *et al.*, 2002). El mutante *sos1-1* de *Arabidopsis* presenta una delección de 14 pb en la región codificante de SOS1 que anula

completamente la funcionalidad del transportador y pone de manifiesto un fenotipo de halosensibilidad severa que imposibilita su crecimiento en presencia de un estrés salino moderado (hasta 50 mM NaCl) (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002). Sin embargo cuando en el mutante *sos1-1* se expresa una copia exógena y funcional del antiportador AtSOS1, el fenotipo de halosensibilidad se suprime hasta un nivel similar al de la planta silvestre (Shi *et al.*, 2000). Así pues con objeto de extender la comparación funcional entre OsSOS1 y AtSOS1 a plantas completas, el mutante *sos1-1* de *Arabidopsis* se transformó con el ADNc completo de *OsSOS1* y se ensayó su efecto en la halotolerancia de los transformantes. Para ello el ADNc de *OsSOS1* se insertó en el vector binario pBI321 mediante el clonaje consecutivo de dos segmentos. En primer lugar un fragmento *Sall-BamHI* de 2,3 Kb se insertó en los sitios *XhoI-BamHI* del vector; posteriormente el fragmento restante de 1,3 Kb se insertó en la orientación apropiada en el sitio *BamHI* del pBI321, reconstruyéndose así el ADNc completo de OsSOS1 para su expresión en plantas bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 se transformó con las construcciones pBIOsSOS1, además de pBIAtSOS1 (Shi *et al.*, 2002) y vector vacío pBI321 como controles positivo y negativo, respectivamente. Se observó que el plásmido pBIOsSOS1 experimentaba considerables reorganizaciones de secuencia cuando el transformante de *Agrobacterium* se crecía en medio LB convencional, pero que dichos cambios se minimizaban cuando en el medio se sustituía la sal sódica por 1% KCl. Plantas de *Arabidopsis* mutantes *sos1-1* se agroinfectaron con las bacterias transformadas (crecidas en presencia de KCl) y las semillas resultantes se seleccionaron para obtener líneas transgénicas (T1) OsSOS1, AtSOS1 y control con el vector vacío. Se autopolinizaron 20 líneas transgénicas independientes para obtener plantas de generación T2 y la presencia y expresión de OsSOS1 se confirmó posteriormente por PCR y RT-PCR, respectivamente, utilizando oligos específicos para el transgén (resultados no mostrados). Adicionalmente el fondo genético *sos1-1* se confirmó en cada una de las líneas mediante diagnóstico por PCR de la deleción de 14 pb que define al alelo mutante (Shi *et al.*, 2000) tal y como se describe en el apartado III.6.B.1. Los ensayos de complementación se realizaron mediante transferencia de plántulas transgénicas T2, previamente seleccionadas en kanamicina, a medios suplementado con 0, 50 y 65 mM de NaCl. De 16 líneas transgénicas OsSOS1 ensayadas, diez resultaron capaces de suprimir el fenotipo del mutante permitiendo su crecimiento en medios con hasta 65 mM de NaCl. Sin embargo dicha supresión fenotípica fue solamente parcial pues el crecimiento de las líneas congénicas transformadas con el ADNc de *AtSOS1* fue superior comparado con el de aquellas que expresaban la proteína de arroz, tanto en presencia como en ausencia de sal (Figura 22). Estos resultados indican que el homólogo de arroz OsSOS1 puede, aunque sólo parcialmente, sustituir *in planta* al transportador endógeno de *Arabidopsis*.

IV/II. 6. Respuesta del transcrito OsSOS1 al estrés salino.

Para evaluar cómo se modifica la expresión de OsSOS1 en respuesta al estrés salino se preparó una membrana de nylon con RNA total purificado de raíces y parte aérea de plantas de arroz (*Oryza sativa* cv *Nipponbare*) sometidas a un choque salino con 100 mM de NaCl durante 0, 3, 15 y 48 horas. La hibridación se efectuó con una sonda de ADN radiomarcada (P^{32}) preparada a partir del fragmento *HindIII-HindIII* de 1,7 Kb correspondiente a la región carboxiterminal del ADNc de OsSOS1. Las señales radiométricas se cuantificaron mediante escaneo densitométrico de la autoradiografía y las intensidades relativas se normalizaron por rehibridación de la membrana con una sonda de ADN correspondiente al fragmento de 18S del ARN ribosomal (Delcasso-Tremousaygue *et al.*, 1988). Adicionalmente se efectuó un control de la especificidad de la sonda OsSOS1 mediante hibridación a una membrana de nylon preparada con ADN genómico de *O. sativa* cv *Nipponbare* digerido con diversas restrictasas (*BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *XhoI*). Se detectaron niveles de expresión basales de OsSOS1 tanto en las raíces como en la parte aérea de las plantas control, no tratadas. Al cabo de 3 horas de exposición a sal, en raíces se observa un lento pero transitorio aumento de los niveles de transcrito OsSOS1 que alcanza su máximo a las 15 horas del inicio del tratamiento, cuando los niveles de transcrito han superado a los basales en 6 veces (Figura 23). En la parte aérea, en cambio, el efecto del choque salino es el opuesto. A las 3 horas del inicio del tratamiento con sal los niveles del transcrito OsSOS1 en la parte aérea se reducen hasta en 5 veces con respecto al nivel basal encontrado en las plantas control (Figura 23). Dicha reducción en la expresión es también transitoria pues, desde que alcanzan su mínimo a las 3 horas del inicio del tratamiento, los niveles de transcrito en la parte aérea se recuperan lentamente hasta prácticamente reestablecer el nivel basal al cabo de 48 horas de exposición a sal. Estos resultados sugieren una implicación funcional de OsSOS1 en la respuesta de la planta de arroz al estrés salino.

IV/II. 7. Identificación del complejo kinasa de arroz que active a OsSOS1.

De los resultados obtenidos por la caracterización funcional de OsSOS1 se deduce que, al igual que AtSOS1, el antiportador de arroz OsSOS1 podría precisar *in vivo* de algún modulador homólogo al complejo kinasa de *Arabidopsis* SOS2/SOS3 para desarrollar su máxima actividad antiportadora de Na^+ . Pese a que las secuencias genómicas de *O. sativa*, disponibles en las bases de datos no están aún completas y sólo parcialmente ensambladas, se han identificado en ambas subespecies, *índica* y *japónica*, al menos 30 miembros de la familia SnRK3 de kinasas CIPK/PKS y 10 miembros de la familia de sensores de Ca^{++} CBL/SCaBP interaccionantes (Kolukisaoglu *et al.*, 2004).

IV/II. 7. A. Identificación y caracterización funcional del homólogo de AtSOS3 en arroz.

Con objeto de identificar al miembro modulador de máxima homología con AtSOS3/CBL4 de entre la decena de proteínas CBL de arroz (Kolukisaoglu *et al.*, 2004), sus secuencias polipeptídicas se recuperaron de la base de datos para llevar a cabo un alineamiento múltiple, incluyendo la proteína de *Arabidopsis* SOS3/CBL4 (Figura 24). Con base en dicho alineamiento, las proteínas de arroz más similares a SOS3 de *Arabidopsis* son OsCBL4 (Os05g45810), OsCBL7 (Os02g18880) y OsCBL8 (Os02g18930), con un 66.2%, 67.1% y 66.7% de identidad con AtSOS3 respectivamente (Figura 24). El resto de los miembros OsCBL presentan identidades significativamente inferiores. Como AtSOS3, los tres homólogos de arroz se predicen ser proteínas miristoilables, una modificación post-traduccional que es esencial para la funcionalidad de SOS3 (Ishitani *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2005). Todos los miembros de la familia de CBLs contienen 4 motivos EF-hand conservados para la unión a Ca⁺⁺, separados por secuencias intermediarias de longitud fija. Las variaciones de tamaño y secuencia entre las proteínas CBL están por lo tanto restringidas principalmente a las extensiones amino y carboxiterminal desde la parte central conservada (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Puesto que la región aminoterminal de AtSOS3 es más similar a la de OsCBL4 que a la de OsCBL7 y OsCBL8 (Figura 24) y, al igual que SOS3, OsCBL4 se localiza en la membrana plasmática (Hwang *et al.*, 2005), para llevar a cabo ensayos funcionales en levaduras y plantas se preseleccionó OsCBL4 como el putativo homólogo funcional de SOS3. Con dicho fin se procedió al clonaje de su ADNc completo mediante RT-PCR con los oligos OsCBL4-f y OsCBL4-r (Anexo I) a partir de RNA total aislado de plantas de *Oryza sativa* subsp. *japónica* cv *Nipponbare*. El fragmento de ADNc amplificado se clonó en el vector pCR®Blunt II TOPO (Invitrogen) y se determinó su secuencia completa para descartar la ausencia de intrones no procesados y de fallos en la replicación de las polimerasas. El gen *OsCBL4* se corresponde al locus Os05g45810 en el genoma de *O. sativa* subsp. *japónica* y su ADNc completo, depositado en la base de datos con la entrada AK101368, codifica para una proteína de 211 aminoácidos.

IV/II. 7. A. 1. Caracterización funcional de OsCBL4 en *S. cerevisiae*.

Con objeto de demostrar la identidad funcional entre OsCBL4 y AtSOS3, mediante su expresión heteróloga en la levadura, se procedió a ensayar la capacidad de la proteína de arroz OsCBL4 de interactuar con la kinasa de Arabidopsis, AtSOS2 para formar un complejo kinasa activo capaz de potenciar al antiportador AtSOS1. Con dicho fin y mediante la inserción del ADNc completo de OsCBL4 (procendente del vector pCR®Blunt II TOPO-OsCBL4), como un fragmento *XhoI-BamHI*, en los mismos sitios de restricción del vector multicopia pDR195 (Rentsch *et al.*, 1995) se preparó una construcción (pDROsCBL4) que permitiría la expresión constitutiva en la levadura de la proteína bajo el control del promotor del gen *PMA1*. Para los ensayos de actividad, y con objeto de recuperar uno de los marcadores auxotróficos, se

seleccionó la cepa de *S. cerevisiae* YP890 que, sobre el fondo genético AXT3K ($\Delta ena1-4 \Delta nha1 \Delta nhx1$), posee una integración cromosómica de un casete de expresión del antiportador de *Arabidopsis* AtSOS1 regulada por el promotor del gen *PGK1*. Dicha cepa de levadura se transformó OsCBL4 (pDROsCBL4) en presencia y ausencia de la kinasa interaccionante AtSOS2 y la halotolerancia de los transformantes se determinó mediante ensayos por goteo de diluciones seriadas. Como se observa en la Figura 25 la coexpresión de AtSOS1 y AtSOS2 conjuntamente con la proteína de arroz OsCBL4 recupera plenamente la halotolerancia de la cepa de levadura observándose crecimiento celular en medio AP con hasta 400 mM de Na^+ (1mM K^+), hecho que no ocurre con los transformantes control con pDR195. Este resultado demuestra que OsCBL4 actúa en la levadura como un homólogo funcional de AtSOS3, reconociendo a la kinasa de *Arabidopsis* AtSOS2 para promover así la activación del antiportador SOS1.

IV/II. 7. A. 2. Complementación de mutantes *sos3-1* de *Arabidopsis* con el homólogo de arroz OsCBL4.

En el apartado anterior se ha demostrado que *OsCBL4*, expresado de manera heteróloga en la levadura, se comporta como un homólogo funcional de AtSOS3, formando con AtSOS2 un complejo kinasa activo que potencia la actividad transportadora de OsSOS1. No obstante éste es un resultado provisional pues las actividades observadas en la levadura pueden ser una consecuencia del entorno del sistema heterólogo y no ser directamente extrapolables a la célula vegetal. Para confirmar estos resultados mediante ensayos funcionales *in planta* se procedió a la complementación génica del mutante *sos3-1* de *Arabidopsis*. El mutante *sos3-1* de *Arabidopsis* presenta una deleción de 9 pb desde el nucleótido +759 de la secuencia genómica de *SOS3* que anula completamente la funcionalidad de la proteína y pone de manifiesto un fenotipo de halosensibilidad que imposibilita su crecimiento en medios con una concentración de Na^+ superior a 100 mM (Liu *et al.*, 1997; 1998) y que se suprime cuando el mutante *sos3-1* se expresa una copia exógena y funcional de AtSOS3 (Ishitani *et al.*, 2000). Para confirmar *in planta* la equivalencia funcional entre OsCBL4 y AtSOS3 se procedió a la complementación del mutante *sos3-1* de *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 1998) con la proteína de arroz OsCBL4. Mediante la inserción del ADNc completo de OsCBL4, procedente del vector pCR®Blunt II TOPO-OsCBL4, como un fragmento XhoI-BamHI en los mismos sitios de restricción del vector binario pBI321 se obtuvo la construcción pBIOsCBL4, que nos permitiría dirigir su expresión constitutiva en plantas bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La cepa de *A. tumefaciens* GV3101 se transformó con la construcción pBIOsCBL4, además del vector vacío como control negativo, cuidando siempre de utilizar LBK como medio de selección y crecimiento, para así evitar las reorganizaciones de secuencia observadas anteriormente con el vector pBIOsSOS1. Plantas de *Arabidopsis* mutantes *sos3-1* se agroinfectaron con las bacterias

transformadas (crecidas en presencia de KCl) y las semillas resultantes se seleccionaron para obtener líneas transgénicas (T1) OsCBL4 y control. Se autopolinizaron 10 líneas transgénicas independientes para obtener plantas de generación T2 y la presencia y expresión de OsCBL4 se confirmó posteriormente por PCR y RT-PCR respectivamente, utilizando oligos específicos para el transgén (resultados no mostrados). Adicionalmente el fondo genético *sos3-1* se confirmó en cada una de las líneas mediante diagnóstico por PCR de la delección de 9 pb que define al alelo mutante (Liu *et al.*, 1998) tal y como se describe en el apartado III.6.B.3 (resultados no mostrados). Los ensayos de complementación se realizaron mediante transferencia de plántulas transgénicas T2, previamente seleccionadas en kanamicina, a placas de MS suplementadas con 0, 100 y 125 mM de NaCl. Como controles positivo y negativo se utilizaron líneas silvestres Col-0 *gll* y mutante *sos3-1*, respectivamente, transformadas con el vector vacío pBI321. El total de las líneas transgénicas ensayadas (5 líneas) presentaban una supresión en mayor o menor grado el fenotipo del mutante *sos3-1*, mostrando crecimiento en medios con 100 mM de NaCl (Figura 26). Además, a diferencia con la complementación del mutante *sos1-1* por OsSOS1, la complementación esta vez fue completa pues las líneas transgénicas *sos3-1* expresando OsCBL4 exhibieron un crecimiento en medios salinizados muy similar al de las plantas silvestres. Este resultado demuestra la capacidad del homólogo de arroz OsCBL4 para sustituir *in planta* la proteína endógena de *Arabidopsis* AtSOS3 y confirma la homología funcional entre ambas proteínas.

IV/II. 7. B. Identificación y caracterización funcional del homólogo de AtSOS2 en arroz.

Puesto que, como se demuestra en las Figuras 18, 20 y 21, la kinasa AtSOS2 de *Arabidopsis* no sólo activa al antiportador de arroz OsSOS1 sino que además lo fosforila, el criterio de selección de la kinasa homóloga de entre los treinta miembros de la familia de kinasas CIPK/PKS de arroz se fundamentó en la similitud de secuencia aminoacídica con AtSOS2. Con dicho fin se recuperaron de la base de datos las secuencias polipeptídicas de la treintena de kinasas CIPK de arroz y se realizó un alineamiento múltiple de sus secuencias, incluyendo a la kinasa de *Arabidopsis* AtSOS2. Del análisis filogenético de dicho alineamiento (Figura 27) se observa que la secuencia que presenta mayor colinealidad con AtSOS2 es la de la kinasa de arroz OsCIPK24 (entrada AK102270), con un 68.2% de identidad, seguida por OsCIPK8 cuya identidad alcanza el 62%. En cambio los miembros que presentan mayor divergencia con la kinasa de *Arabidopsis* son OsCIPK4 y 7 (35.8% de identidad), seguidos a corta distancia por OsCIPK25 (36.7% de identidad). Puesto que OsCIPK8 es más similar a AtCIPK8 que a AtSOS2 (72,6% de identidad frente al 62% respectivamente) y OsCIPK24 es la isoforma con máxima identidad con AtSOS2, para llevar a cabo ensayos funcionales en levaduras y plantas se preseleccionó OsCIPK24 como el putativo homólogo funcional de la kinasa AtSOS2 de *Arabidopsis*. Con dicho fin se procedió al clonaje del ADNc completo de

OsCIPK24 mediante RT-PCR con los oligos OsK24-f y OsK24-r a partir de RNA total aislado de plantas de *Oryza sativa* subsp. *japónica* cv *Nipponbare*. El fragmento de ADNc amplificado se clonó en el vector pCR®Blunt II TOPO (Invitrogen) y se determinó su secuencia completa para descartar la ausencia de intrones no procesados y de fallos en la replicación de las polimerasas. El gen *OsCIPK24* se corresponde al locus Os06g40370 en el genoma de *O. sativa* subsp. *japónica* y su ADNc completo, depositado en la base de datos con la entrada AK102270, codifica para una proteína de 454 aminoácidos.

IV/II. 7. B. 1. Caracterización funcional de OsCIPK24 en *S. cerevisiae*.

Con objeto de demostrar la identidad funcional entre OsCIPK24 y AtSOS2 mediante su expresión heteróloga en la levadura, se procedió a ensayar la capacidad de la kinasa OsCIPK24 de potenciar la actividad antiportadora Na^+/H^+ de SOS1 de *Arabidopsis* y de arroz. Para ello y mediante la inserción del ADNc completo de OsCIPK24 (procedente del vector pCR®Blunt II TOPO-OsCIPK24) como un fragmento *EcoRI-EcoRI* en el sentido apropiado del vector multicopia p414GPD (Mumberg *et al.*, 1995), se obtuvo la construcción p414OsCIPK24 que permitiría la expresión en la levadura de la kinasa de arroz bajo el control del promotor constitutivo del gen *GPD1*. Para los ensayos de actividad, y con objeto de recuperar uno de los marcadores auxotróficos, se seleccionó la cepa de *S. cerevisiae* YP890 (Guo *et al.*, 2004) que, sobre el fondo genético AXT3K ($\Delta\text{ena1-4 } \Delta\text{nhal } \Delta\text{nhx1}$), tiene una integración cromosómica para la expresión del antiportador de *Arabidopsis* AtSOS1 regulada por el promotor del gen *PGK1*. Dicha cepa de levadura se transformó con OsCIPK24 (p414OsCIPK24), en presencia y ausencia de OsCBL4 y la halotolerancia de los transformantes se determinó mediante ensayos por goteo de diluciones seriadas. Inesperadamente se encontró que la kinasa de arroz era incapaz de activar al antiportador de *Arabidopsis* AtSOS1, ni por sí sola ni en presencia del modulador OsCBL4, lo que se deduce de la deficiente halotolerancia que mostraron los transformantes que coexpresaban las tres proteínas SOS, apenas diferenciable de los transformantes control sin la kinasa. Para analizar si este fallo se debía a la incapacidad de OsCIPK24 de interactuar con OsCBL4, o de reconocer a AtSOS1 como sustrato, se preparó una forma mutante e independiente de CBL de la kinasa OsCIPK24 mediante la delección del dominio carboxiterminal autoinhibitorio presente en las kinasas SnRK3 (Albrecht *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001). Con dicho fin, en base a la localización conocida del dominio autoinhibitorio de AtSOS2 (Guo *et al.*, 2001) se diseñó el oligo OsK24 Δ 315-r que introduce un codón de parada en el residuo de L315 del extremo carboxiterminal de OsCIPK24, que es análogo al residuo de leucina en la posición 308 de AtSOS2. El fragmento correspondiente al ADNc truncado OsCIPK24 Δ 315 se amplificó por PCR con la polimerasa *Pfu* y la pareja de oligos OsK24-f y OsK24 Δ 315-r, utilizando el vector p414OsCIPK24 como molde, que se clonó en el vector pCR®Blunt II TOPO y posteriormente se secuenció al completo para descartar posibles

errores en la transcripción por la polimerasa y/o en los oligos sintetizados. A continuación se liberó como un fragmento EcoRI-EcoRI y se subclonó en el sentido apropiado del vector multicopia p414GPD (Mumberg *et al.*, 1995) para obtener la construcción p414OsCIPK24Δ315, que permitiría la expresión en la levadura de la kinasa de arroz, potencialmente hiperactiva, bajo el control del promotor constitutivo *GPD1*. Las cepas de levadura YP890 e YP1021, que poseen integraciones cromosómicas que permiten la expresión constitutiva del antiportador SOS1 de *Arabidopsis* y arroz, respectivamente, se transformaron con la kinasa truncada (p414OsCIPK24Δ315) y el vector vacío p414GPD, en ausencia del potencial modulador OsCBL4. La halotolerancia de los transformantes se determinó mediante ensayos por goteo de diluciones seriadas. Nuevamente la kinasa de arroz OsCIPK24Δ315 fue incapaz de potenciar la actividad antiportadora de SOS1 de *Arabidopsis* o de arroz, pues el crecimiento del transformante con OsCIPK24Δ315 en medios salinizados no superaba al del transformante control con un vector vacío. A la vista de los resultados negativos, la explicación más razonable sería que OsCIPK24 no es el homólogo funcional de AtSOS2, o bien que la proteína sintetizada en la levadura es biológicamente inactiva. Una inspección más exhaustiva de la secuencia codificante completa del ADNc aislado en este trabajo en base al clon EST AK102270 reveló que una traducción conceptual iniciada en un codon ATG localizado en la posición +19, correspondiente a la metionina en la posición +7, predecía una proteína más corta pero con una mayor similitud con el extremo aminoterminal de AtSOS2 (Figura 27). Para ensayar en la levadura la funcionalidad de esta variante más corta de OsCIPK24, un fragmento de 0,5 Kb del extremo aminoterminal de OsCIPK24 se amplificó con la polimerasa *Pfu* y los oligos OsStuI-r y OsM2-f (Anexo I), que desplazan el inicio de la transcripción al nuevo codon ATG en la posición +19. Éste se clonó en el vector pCR@Blunt II TOPO y, una vez comprobada su secuencia, se subclonó como un fragmento BamHI-StuI en las construcciones p414OsCIPK24 y p414OsCIPK24Δ315, sustituyendo así a los fragmentos originales con el inicio de la transcripción en el codon ATG +1. Con estas nuevas construcciones, p414OsCIPK24 y p414OsCIPK24Δ309, portando las versiones de OsCIPK24 acortadas en el extremo aminoterminal, se repitieron los ensayos de funcionalidad en levaduras con resultados muy diferentes. La cepa de levadura AXT3K ($\Delta ena1-4 \Delta nha1 \Delta nhx1$) se transformó con OsSOS1 (pDROsSOS1) en presencia y ausencia de la kinasa OsCIPK24Δ309, y la halotolerancia de los transformantes se determinó mediante ensayos por goteo de diluciones seriadas. Como se observa en la Figura 25 la coexpresión de OsSOS1 y OsCIPK24Δ309 en ausencia del sensor OsCBL4, recupera plenamente la halotolerancia de la cepa observándose crecimiento celular en medio AP suplementado con 200 mM de Na⁺ (1mM K⁺), hecho que no ocurre con los transformantes control sin la kinasa. Este resultado, además de confirmar la funcionalidad de la kinasa OsCIPK24 acortada en su extremo aminoterminal, demuestra que la delección Δ309 elimina una región posiblemente autoinhibitoria y produce una kinasa

constitutivamente activa que no precisa de un modulador CBL para potenciar la actividad transportadora de OsSOS1, de forma análoga a como ocurre con AtSOS2. Por otro lado las cepas de levadura YP890 e YP1021, que poseen una integración cromosómica para la expresión del antiportador SOS1 de *Arabidopsis* y arroz respectivamente, se transformaron con la kinasa OsCIPK24 completa (con el inicio desplazado al ATG en la posición +19), en presencia y ausencia de OsCBL4, y la halotolerancia de los transformantes se determinó mediante ensayos por goteo de diluciones decimales. Como se observa en la Figura 25, la kinasa completa OsCIPK24 expresada en la levadura interacciona productivamente con OsCBL4 para activar a los intercambiadores de *Arabidopsis* (AtSOS1) y arroz (OsSOS1), pero fracasa en la activación completa de ambos transportadores en ausencia del sensor OsCBL4. Esta halotolerancia incrementada se observó únicamente en presencia de OsCIPK24, descartando la posibilidad de que OsCBL4 desenmascarase ninguna actividad endógena en la levadura. Estos resultados demuestran que OsCIPK24 actúa en la levadura como un homólogo funcional de AtSOS2 reconociendo y activando indistintamente a los antiportadores Na^+/H^+ de *Arabidopsis* (AtSOS1) y arroz (OsSOS1).

IV/II. 7. B. 2. Complementación de mutantes *sos2-2* de *Arabidopsis* con el homólogo de arroz OsCIPK24.

Como se demuestra en el apartado anterior, OsCIPK24 se comporta como un homólogo funcional de AtSOS2 cuando se expresa en la levadura, formando con OsCBL4 un complejo kinasa activo que potencia la actividad transportadora de los antiportadores de *Arabidopsis* (AtSOS1) y arroz (OsSOS1). No obstante, como se argumenta en apartados anteriores, la caracterización funcional en *S. cerevisiae* proporciona un resultado provisional que debe ser confirmado mediante ensayos funcionales *in planta*. El mutante *sos2-2* de *Arabidopsis* presenta una delección de 2 pb desde el nucleótido +1521 de la secuencia genómica de *SOS2* que anula completamente la funcionalidad de la kinasa y pone de manifiesto un fenotipo de halosensibilidad que imposibilita su crecimiento en presencia de un estrés por Na^+ (75 mM NaCl), por Li^+ o por deficiencia de potasio (Zhu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando en el mutante *sos2-2* se expresa una copia exógena y funcional de la kinasa SOS2, el fenotipo de halosensibilidad se suprime hasta un nivel similar al de la planta silvestre (Guo *et al.*, 2004). Por lo tanto, para extender la comparación funcional entre OsCIPK24 y AtSOS2 a plantas completas, se procedió a la complementación del mutante *sos2-2* de *Arabidopsis* con OsCIPK24. Con dicho fin y mediante la inserción de su ADNc completo (con el inicio desplazado al ATG en posición +19), procedente del vector p414GPDOSIPK24, como un fragmento *XbaI-XhoI* en los mismos sitios de restricción del vector binario pBI321 se preparó una construcción (pBIOsCIPK24) que nos permitiría dirigir su expresión constitutiva en plantas bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La cepa de *A. tumefaciens*

GV3101 se transformó con la construcción pBIOsCIPK24, además del vector vacío como control negativo, cuidando siempre de utilizar LBK como medio de selección y crecimiento, para así evitar las reorganizaciones de secuencia observadas anteriormente con el vector pBIOsSOS1. Plantas de *Arabidopsis* mutantes *sos2-2* se agroinfectaron con las bacterias transformadas (crecidas en presencia de KCl) y las semillas resultantes se seleccionaron para obtener líneas transgénicas (T1) OsCIPK24 y control. Se autopolinizaron 10 líneas transgénicas independientes para obtener plantas de generación T2 y la presencia y expresión de OsCIPK24 se confirmó posteriormente por PCR y RT-PCR respectivamente, utilizando oligos específicos para el transgén (resultados no mostrados). Adicionalmente, el fondo genético *sos2-2* se confirmó en cada una de las líneas mediante diagnóstico por PCR de la delección de 2 pb que define al alelo mutante (Liu *et al.*, 2000) tal y como se describe en el apartado III.6.B.2 (resultados no mostrados). Los ensayos de complementación se realizaron mediante transferencia de plántulas transgénicas T2, previamente seleccionadas en kanamicina, a placas de MS suplementadas con 0, 75 y 100 mM de NaCl. Como controles positivo y negativo se utilizaron líneas silvestre Col-0 *gll* y mutante *sos2-2*, respectivamente, transformadas con el vector vacío pBI321. El total de las líneas transgénicas ensayadas (5 líneas) presentaban una clara supresión del fenotipo del mutante *sos2-2*, permitiendo su crecimiento en medios con 75 mM de NaCl (Figura 28). Además, al igual que con la complementación del mutante *sos3-1* por OsCBL4, la complementación fue completa pues las líneas transgénicas *sos2-2* expresando OsCIPK24 exhibieron un crecimiento en medios salinizados muy similar al de las plantas silvestres. Este resultado demuestra la capacidad del homólogo de arroz OsCIPK24 para sustituir in planta a la kinasa endógena de *Arabidopsis* AtSOS2 y confirma la homología funcional entre ambas proteínas. En conjunto estos resultados sugieren que el sistema SOS, descrito hasta ahora únicamente en *Arabidopsis*, parece tener un equivalente homólogo en *O. sativa* y que además cada uno de los miembros que lo conforman conserva una homología tal en ambos organismos, arroz y *Arabidopsis* que los hace, funcionalmente intercambiables entre sí.

V. DISCUSIÓN

V. 1. Identificación del dominio de reconocimiento y dianas de fosforilación de SOS1 por la kinasa SOS2.

La activación bioquímica del intercambio Na^+/H^+ de SOS1 mediante la fosforilación del antiportador por el complejo kinasa SOS2/SOS3 o la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308 se había demostrado previamente en nuestro laboratorio mediante la coexpresión heteróloga de las proteínas SOS en una cepa de levadura halosensible carente de los transportadores de sodio endógenos (Quintero *et al.*, 2002). Adicionalmente se observó que el complejo kinasa SOS2/SOS3 promovía la fosforilación de SOS1 en fracciones de membrana plasmática de levadura, y que la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308 aislada de bacterias era capaz de fosforilar *in vitro* al antiportador SOS1 purificado. El conjunto de antecedentes experimentales apuntan a un mecanismo de activación del antiportador mediado por una reacción de fosforilación, pero en el momento de comenzar esta Tesis se desconocía el dominio de reconocimiento de SOS1 por la kinasa SOS2 y además no existían datos experimentales que asociaran el proceso de fosforilación con la actividad antiportadora de SOS1. SOS2 es una proteín-kinasa de serina y treonina con un dominio aminoterminal catalítico similar a la proteína de levadura SNF1 y a las kinasas dependientes de AMPc de animales (Liu *et al.*, 2000). La región carboxiterminal de SOS2 es en cambio única en plantas y alberga un dominio autoinhibitorio (dominio FISL/NAF) que interacciona físicamente con SOS3 y cuya delección resulta en una kinasa SOS2 constitutivamente activa e independiente de SOS3 (SOS2 Δ 308; Guo *et al.*, 2004). Un estudio bioquímico que compara la afinidad de distintas versiones hiperactivas de la kinasa por diversos péptidos sintéticos ha demostrado que la secuencia mínima de reconocimiento de SOS2 (hidrofóbico-X-básico-X (2)-Ser-X (3)-hidrofóbico) es similar a las anteriormente descritas para SNF1 y kinasas de tipo SnRK1 y comporta residuos hidrofóbicos y básicos que son determinantes de la especificidad del sustrato (Guo *et al.*, 2001; Dale *et al.*, 1995; Ball *et al.*, 1995; Sugden *et al.*, 1999). Además esta especificidad es independiente de la presencia/ausencia del dominio autoinhibitorio de SOS2 (Gong *et al.*, 2002c). En el extremo carboxiterminal de SOS1 existe una secuencia [1126]-DEGIVVR**IDSPSKIVFR**NDL-[1146] que coincide con este consenso, por el que se predice que posiblemente la serina 1136 (mostrada en negrita) sea la diana de fosforilación. De conformidad con las predicciones teóricas los resultados obtenidos del análisis espectrofotométrico del antiportador SOS1 fosforilado por SOS2T/D Δ 308 realizados en este trabajo (Figura 10) apuntan a este mismo dominio de reconocimiento (fosfopéptido IDSPSKIVFR), pero la diana de fosforilación determinada experimentalmente resultó ser la serina 1138 y no la serina 1136. Adicionalmente el péptido IDSPSKIVFR se localiza en un dominio del extremo carboxiterminal de SOS1 que

está altamente conservado entre los homólogos de *SOS1* depositados en las bases de datos (Figura 11). El alineamiento de sus secuencias aminoacídicas indica que tanto la serina 1138 como la serina 1136 están conservadas en los homólogos de *SOS1* de dicotiledóneas (*Theellungiella halophita*, *Lycopersicon esculentum*, *Mesembryanthemum crystallinum*), algas (*Cymodocea nodosa*), musgos (*Physcomitrella patens*) y monocotiledóneas (*Oryza sativa*, *Triticum aestivum*). El hecho de que ambos residuos estén conservado en monocotiledóneas es un buen punto de partida pues sabemos (Capítulo II de esta Tesis) que el homólogo de arroz también se fosforila y activa por la kinasa SOS2T/D Δ 308 de *Arabidopsis*. No deja de sorprender no obstante el hecho de que la serina 1136 que se predecía como posible diana específica de fosforilación por SOS2, no sólo en base a la secuencia consenso de fosforilación por SOS2 (Gong *et al.*, 2002c), sino también por su alto grado de conservación entre los homólogos de *SOS1*, no aparezca fosforilada en los resultados de espectrometría de masas. Por la inespecificidad inherente al análisis espectrofotométrico de fosfopéptidos no es posible saber si se trata una serina que no se fosforila fisiológicamente o estamos ante un falso negativo, pero por motivos de proximidad con la fosfoserina 1138 dentro del dominio de residuos hidrofóbicos y básicos que reconoce SOS2, y por su alto grado de conservación entre los homólogos conocidos de *SOS1*, se incluyó, junto a la serina 1138, en los ensayos bioquímicos y moleculares para confirmar la relevancia este dominio de fosforilación en el proceso de activación del antiportador por la kinasa SOS2. Mutantes puntuales del antiportador SOS1 que sustituyen estas dianas de fosforilación por residuos no fosforilables de alanina (SOS1-S1136A, SOS1-S1138A y SOS1-S1136A/S1138A) expresados en una cepa de levadura que carece de los principales sistemas para la extrusión de sodio (el conjunto de bombas de sodio ENA1-ENA4, y los intercambiadores Na⁺, K⁺/H⁺ de membrana plasmática NHA1 y vacuola NHX1) en presencia de la kinasa SOS2T/D Δ 308 fueron incapaces de suprimir el fenotipo de halosensibilidad de esta cepa hasta el nivel alcanzado por el antiportador silvestre activado por SOS2T/D Δ 308 (Figura 13). Este resultado está de acuerdo con la ausencia de fosforilación observada *in vitro* por SOS2T/D Δ 308 del segmento Δ 441-1146 del extremo carboxiterminal de SOS1 mutantes SOS1-S1136A, SOS1-S1138A, y SOS1-S1136A/S1138A, en relación al mismo fragmento de la proteína silvestre (Figura 12). Finalmente la complementación parcial del fenotipo de halosensibilidad observada en los mutantes de *Arabidopsis sos1-1* que expresan el antiportador SOS1-S1136A/S1138A (Figura 15) es un dato más que, en concordancia con los anteriores, confirma la clara falta de funcionalidad de los mutantes puntuales de fosforilación (SOS1-S1136A, SOS1-S1138A, y SOS1-S1136A/S1138A) en relación a la fosforilación y activación por la kinasa SOS2. La mutación de las serinas 1136 y 1138 a residuos de alanina parece no haber deteriorado significativamente la actividad basal del antiportador, hecho que se deduce de la complementación parcial observada *in vivo* tanto en la levadura (Figura 13) como

en plantas de *Arabidopsis* (Figura 15). La actividad antiportadora en presencia de la kinasa se mantiene en ambos casos al nivel que exhibe el antiportador silvestre en ausencia de SOS2. En consecuencia se podría afirmar que tanto la serina consenso 1136, como la fosfoserina observada en la espectrometría de masas S1138, son cruciales en el proceso de activación del antiportador por la kinasa SOS2 ya que la modificación de cualquiera de ellas en los mutantes puntuales simples SOS1-S1136A y SOS1-S1138A, incapacita al antiportador para su fosforilación y activación por la SOS2 (Figuras 12 y 13). A pesar de que nuestros resultados no han podido demostrar la fosforilación de la serina 1136, la deficiencia del mutante SOS1-S1136A en relación a su activación y fosforilación por SOS2 ponen de manifiesto su relevancia en el reconocimiento de SOS1 por la kinasa SOS2. Adicionalmente la incapacidad de los mutantes SOS1-S1136A, SOS1-S1138A y SOS1-S1136A/S1138A, para ser activados *in vivo* por la kinasa (Figura 13) indica que posiblemente no exista ninguna otra diana específica de fosforilación por SOS2 y que por lo tanto el único mecanismo de activación de SOS1 por esta kinasa sea la fosforilación de la serina 1138 en el dominio carboxiterminal [1130]-VVRIDSPSKI-[1141]. Esta es la primera caracterización bioquímica y molecular de un dominio genuino de reconocimiento y fosforilación por una kinasa de tipo CIPK y la primera vez que se demuestra la relevancia de la fosforilación del antiportador SOS1 en la funcionalidad *in planta* de la proteína.

En un cribado de mutantes aleatorios del antiportador SOS1 realizado en nuestro laboratorio se encontró que la delección del extremo carboxiterminal a partir del residuo de glutamina 998 genera un antiportador altamente hiperactivo y cuya actividad es independiente sus moduladores SOS2 y SOS3 (Pardo *et al.*, 2005). Este mutante expresado en levaduras mostraba una actividad antiportadora insólita, capaz por sí solo de llevar la halotolerancia de la cepa AXT3K a un nivel superior al del antiportador SOS1 silvestre en presencia del complejo SOS2/SOS3, e incluso de la halotolerancia de la cepa silvestre W303. Este resultado indica que posiblemente la región del extremo carboxiterminal de SOS1 que va desde el residuo 998 hasta el final de la proteína incluyendo el dominio de reconocimiento por SOS2, ejerza un efecto autoinhibitorio sobre la actividad antiportadora de SOS1 y que dicho efecto se suprima de manera fisiológica mediante la fosforilación por SOS2 del residuo de serina 1138 en el dominio carboxiterminal [1130]-VVRIDSPSKI-[1141]. No obstante el hecho de que la actividad del antiportador silvestre potenciado por el complejo SOS2/SOS3 siga siendo inferior a la actividad demostrada por el mutante SOS1 Δ 998 en la levadura, podría apuntar a la existencia de un mecanismo alternativo de activación de SOS1 a un nivel de transporte superior que esté regulado por alguna otra proteína moduladora desconocida. En este sentido, en el mismo cribado de mutantes de SOS1 se encontró que la delección del extremo carboxiterminal a partir del residuo de leucina 745 generaba una proteína con una actividad antiportadora prácticamente

nula en la levadura tanto en presencia como en ausencia del complejo SOS2/SOS3. Del análisis de los mutantes afuncionales de *Arabidopsis sos1-2*, *sos1-8* y *sos1-9*, descritos por Shi *et al.* (2000) y que modifican la región comprendida entre los residuos 745 y 997 de extremo carboxiterminal de SOS1 se deduce que esta región ($\Delta 745-997$) del extremo carboxiterminal de SOS1 alberga un dominio de activación cuya integridad, por razones que aún escapan a nuestro conocimiento, resulta crucial para el desarrollo de la actividad antiportadora de SOS1. Este mismo dominio de activación alberga una putativa región de unión a nucleótidos cíclicos. Aunque existen evidencias que vinculan los nucleótidos cíclicos a la tolerancia salina de *Arabidopsis* (Maathuis y Sanders, 2001), no existen datos experimentales que demuestren su implicación en la ruta SOS. Finalmente en nuestro laboratorio se ha demostrado mediante ensayos de doble híbrido en levaduras que estos dominios carboxiterminales de SOS1 de activación e inhibición interactúan entre sí. Por lo tanto, para explicar el conjunto de estos resultados se ha propuesto el modelo que se muestra en la Figura 29. En el estado basal, SOS1 se encuentra autoinhibido por la interacción entre sus dominios carboxiterminales de activación e inhibición. Cuando una señal de calcio promueve la formación del complejo kinasa SOS2/SOS3 y se produce la fosforilación del residuo de serina 1138 en el dominio autoinhibitorio de SOS1, un cambio conformacional tiene lugar en el antiportador que libera al dominio activador de la interacción con el dominio autoinhibidor, promoviendo de este modo el eflujo de Na^+ .

Gran parte de la complejidad de los organismos superiores reside en la modificación post-traducciona específica de las proteínas siendo la fosforilación la más extendida de estas modificaciones. El relevante papel que desempeña la fosforilación de proteínas en la regulación de la señalización celular ha hecho que se intensifiquen los esfuerzos científicos encaminados al desarrollo de tecnologías para el mapeo de estos procesos de fosforilación. La espectrometría de masas en tandem (MS-MS) es hoy día la aproximación más empleada para llevar a cabo este tipo de determinaciones y ha sido la técnica de elección en nuestro estudio del dominio de fosforilación del antiportador SOS1 por la kinasa SOS2. A pesar de las enormes posibilidades que otorga esta técnica, la espectrometría de masas de fosfopéptidos supone aún un gran desafío por tres inconvenientes principales. En primer lugar en los sistemas de detección positiva más comúnmente utilizados el grupo fosfato a menudo ejerce un efecto de supresión de la señal que normalmente impide su detección. Además, el grupo fosfato puede ser bastante inestable y frecuentemente no resiste al proceso de disociación por colisión inducida (CID) necesario para determinación de la secuencia peptídica. Finalmente la dificultad para conseguir una cobertura de la secuencia peptídica completa, especialmente cuando se trata de péptidos largos, péptidos en escasa abundancia o péptidos fosforilados en niveles subestequiométricos supone una dificultad añadida a la detección de fosfopéptidos. Por los motivos anteriormente

expuestos los resultados que se obtienen del análisis espectrométrico de los dominios de fosforilación de una proteína son de carácter orientativo y no pueden ser considerados en sí mismos sin ser respaldados con resultados bioquímicos. La ausencia de fosforilación, por ejemplo, a menudo puede ser el resultado de un falso negativo. Podría ser el caso de la serina 1136 incluida en el fosfopeptido IDSPSKIVFR. Mediante experimentos de fosforilación *in vitro* hemos demostrado que esta serina 1136 es necesaria para la fosforilación de SOS1 por la kinasa hiperactiva SOS2T/D Δ 308; sin embargo la posible fosforilación de esta serina 1136 no ha sido detectada por espectrometría de masas. Quizás su localización en el péptido hagan que un posible evento de fosforilación de la serina 1136 sea más lábil a la disociación peptídica (CID), o bien es posible que el grupo fosfato en dicha localización esté ejerciendo un efecto de apantallamiento sobre la señal de detección. En cualquier caso, los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* con los mutantes simples S1136A y S1138A claramente indican que la serina en posición 1136 es absolutamente necesaria para el reclutamiento y/o fosforilación de SOS1 por la kinasa SOS2. Por otro lado, el hecho de que frecuentemente la reacción de fosforilación se produce con una eficiencia limitada, sumado a la dificultad para conseguir una cobertura completa de la secuencia peptídica de la proteína, han propiciado que en la fosforilación *in vitro* previa al análisis por espectrometría de masas se busque favorecer la reacción de fosforilación mediante la aplicación de condiciones que la potencien y el uso de versiones hiperactivas de la kinasa utilizada, como es el caso de SOS2T/D Δ 308. Aunque estas medidas mejoran considerablemente la eficiencia de la detección de fosfopéptidos, podrían también provocar un estado de hiperfosforilación proteica que conlleva la detección de sitios de fosforilación “forzada” que en condiciones fisiológicas no se producirían, es decir, falsos positivos. Podría ser el caso de la serina 1110, en el fosfopéptido HACQLPLKGESSTR pues aunque no hemos llegado a analizar bioquímicamente este sitio de fosforilación, basándonos en su escaso grado de conservación en otras especies vegetales, es muy probable que se trate de un sitio de fosforilación no fisiológica. Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica de mapeo de sitios de fosforilación proteínica basada en un tipo de proteólisis llamada “fosfoespecífica” que está mediada por una proteasa que reconoce específicamente los sitios de fosforilación (fosfoserinas y fosfotreoninas). La clave de esta aproximación es la transformación química selectiva de los residuos de fosfoserina y fosfotreonina a análogos de lisina, aminoetilcisteína y β -metilaminoetilcisteína, respectivamente. Los péptidos resultantes con residuos de aminoetilcisteína son entonces digeridos con una proteasa lisina-específica que de esta forma reconoce específicamente los sitios de fosforilación (Knight *et al.*, 2003). Este tipo de aproximación tecnológica es un complemento indiscutible a la espectrometría de masas en tandem (MS/MS) en el mapeo de los sitios de fosforilación y que podría mejorar considerablemente la especificidad de los resultados espectrofotométricos.

El sistema de expresión en la levadura *S. cerevisiae* ha sido utilizado extensamente para el aislamiento y caracterización funcional de proteínas individuales de varios organismos y especialmente en el estudio de proteínas de transporte de plantas (Dreyer *et al.*, 1999). Ciertamente ha sido de especial utilidad en el estudio de la regulación del sistema SOS donde la coexpresión de las proteínas SOS nos ha permitido demostrar distintos aspectos de la regulación de SOS1 por el complejo SOS2/SOS3 (Quintero *et al.*, 2002). En nuestro trabajo, este sistema de expresión en la levadura ha sido de gran utilidad en el ensayo *in vivo* de la actividad de los distintos mutantes puntuales de fosforilación debido a la sencillez del proceso de transformación y de la realización de los ensayos de halotolerancia. No obstante este sistema de expresión heteróloga proporciona un resultado provisional pues los componentes celulares de la levadura pueden diferir sustancialmente de los de la célula vegetal y a veces las actividades observadas pueden ser una consecuencia del entorno del sistema heterólogo y no ser extrapolables a la célula vegetal. Por este motivo se ha ensayado la actividad *in planta* del doble mutante puntual SOS1-S1136A/S1138A mediante el estudio de su capacidad para suprimir el fenotipo de sensibilidad a sal de plantas de *Arabidopsis* mutantes *sos1-1*. El mutante *sos1-1* sufre una delección de 14 pb en la región codificante de *SOS1* que anula completamente la funcionalidad del transportador, hecho que se pone de manifiesto por un fenotipo de sensibilidad severa a sal que imposibilita su crecimiento en presencia de un estrés salino moderado (hasta 50 mM NaCl) (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002). La expresión del antiportador *SOS1* silvestre bajo el control de un promotor constitutivo y potente como *CaMV35S* en plantas mutantes *sos1-1* es capaz de aliviar el fenotipo de halosensibilidad de los transformantes (Shi *et al.*, 2000). Como se describe en el apartado IV/I.3.D. de esta Tesis la expresión del alelo mutante SOS1-S1136A/S1138A es capaz de complementar en cierto grado la halosensibilidad del mutante de *Arabidopsis sos1-1* pues las plantas transgénicas *sos1-1* que expresan este alelo del antiportador son capaces de crecer en medio MS con 50 mM de Na⁺, a diferencia de las plantas control *sos1-1* transformadas con el vector vacío (Figura 15). No obstante esta supresión fenotípica es sólo parcial pues la halotolerancia de las líneas congénicas transformadas con el ADNc del antiportador AtSOS1 silvestre bajo el control del mismo promotor demostró ser considerablemente superior comparada con la de aquellas que expresaban la proteína mutada. El número de líneas ensayadas es lo suficientemente significativo como para descartar la posibilidad de que estemos ante un caso de variabilidad de expresión por la inserción arbitraria del gen y las diferencias en la halotolerancia son lo suficientemente notables para poder afirmar que se trata de una complementación parcial. Adicionalmente y mediante la cuantificación del nivel de halotolerancia de las líneas transgénicas *sos1-1* transformadas con SOS1-S1136A/S1138A en relación al mutante *sos2-2*, se ha estimado que esta supresión parcial del fenotipo del mutante *sos1-1* es debida a la

actividad basal del antiportador SOS1-S1136A/S1138A, lo que indica que posiblemente no existan mecanismos de activación del antiportador SOS1 por SOS2 alternativos a la fosforilación de la serina 1138. No obstante esta conclusión podría ser argumentable pues se basa en un resultado que compara la actividad transportadora de SOS1 en dos sistemas diferentes: la expresión desde su localización genómica y promotor endógenos y su expresión desde una localización genómica arbitraria y con el promotor constitutivo *CaMV35S*. Como se observa en la Figura 16, el nivel de actividad de SOS1 inferida a partir de la halotolerancia de plantas silvestres no es comparable a la actividad de SOS1 que se obtiene mediante la inserción exógena y arbitraria del gen en un mutante *sos1-1*, incluso si se utiliza un promotor constitutivamente activo y potente como el *CaMV35S*. Esto es debido a que la localización genómica y los moduladores endógenos del casete de expresión de *SOS1* son específicos del gen y responden de manera óptima a las señales que se desencadenan durante la respuesta al estrés salino, haciendo que la planta silvestre responda en la mayoría de los casos mejor a la imposición del estrés que la planta mutante *sos1-1* con una inserción arbitraria del gen *SOS1* bajo el control de promotores constitutivos exógenos. El casete de expresión $CaMV35S_{PRO-NOS_{TER}}$, pese a contener un promotor constitutivo y muy potente, carece de los sistemas de regulación del promotor endógeno y además su inserción es arbitraria por lo que según la región del genoma en que sea insertado el nivel de expresión será variable en cada línea transgénica. Así pues las plantas de *Arabidopsis* mutantes *sos2-2* aunque carecen de una kinasa SOS2 funcional, en relación a SOS1 se comportan como un silvestre y por lo tanto el nivel de expresión del antiportador no es comparable al de los transformantes *sos1-1* transformada con SOS1-S1136A/S1138A. El control idóneo en este caso sería un doble mutante *sos1-1 x sos2-2* que expresara el antiportador SOS1 silvestre bajo el control del mismo promotor que regula la expresión de SOS1-S1136A/S1138A en las líneas transgénicas ensayadas. La halotolerancia de esta línea control se correspondería por lo tanto con la halotolerancia conferida por la actividad basal del antiportador SOS1 expresado desde el transgén en ausencia de la kinasa SOS2 y su cuantificación resultaría crucial para discernir si el nivel de complementación alcanzado por los transformantes *sos1-1* con SOS1-S1136A/S1138A es el correspondiente a la actividad basal del antiportador o se trata de un escalón intermedio entre la complementación “basal” (SOS1 silvestre en ausencia de SOS2) y la complementación “activa” (SOS1 silvestre en presencia de SOS2). Estos resultados deberían ser comparados con la actividad bioquímica presente en las membranas plasmáticas de esas líneas de *Arabidopsis* (Qiu *et al.*, 2002). Alternativamente, la actividad antiportadora del mutante SOS1-S1136A/S1138A podría ser medida en vesículas de membrana plasmática de levaduras, de una manera similar a las determinaciones realizadas con la proteína de arroz OsSOS1.

V. 2. Caracterización molecular de la ruta de halotolerancia SOS de *Oryza sativa*.

En este trabajo hemos demostrado a través de criterios genéticos y bioquímicos que una proteína de arroz con una similitud de secuencia significativa con el transportador SOS1 de *Arabidopsis* es además su homólogo funcional. En primer lugar, OsSOS1 suprime la sensibilidad a Na^+ de un mutante de levadura que carece de los dos principales sistemas para la extrusión de Na^+ en la membrana plasmática (el conjunto de bombas de Na^+ ENA1-ENA4, y el intercambiador $(\text{Na}^+ \text{K}^+)/\text{H}^+$ NHA1) por medio de un mecanismo que reduce el contenido neto de Na^+ en la célula (Figura 18). Adicionalmente, preparaciones de membrana plasmática obtenidas a partir de transformantes de levadura que expresan OsSOS1 demostraron una mayor capacidad de intercambio Na^+/H^+ (Figura 20). En segundo lugar el complejo kinasa de *Arabidopsis* SOS2/SOS3, que regula positivamente la actividad de AtSOS1 (Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002), también estimula la actividad de OsSOS1, tanto *in vivo* (Figura 18) como en vesículas de membrana plasmática (Figura 20). De conformidad con este resultado, OsSOS1 es reconocido como sustrato de fosforilación por la kinasa AtSOS2 (Figura 21). En tercer y último lugar, OsSOS1 suprime en gran medida la deficiencia en el crecimiento, tanto en presencia como en ausencia de sal, de un mutante *sos1-1* de *Arabidopsis* (Figura 22). Conjuntamente, estos resultados demuestran que *OsSOS1* es un homólogo funcional de *AtSOS1* y representan la primera caracterización bioquímica y molecular de una proteína implicada en la extrusión de Na^+ en monocotiledóneas. Como en *Arabidopsis*, *OsSOS1* es un gen de copia única en *Oryza*. El único ADNc completo que se encontró en las librerías de ADNc disponibles en arroz estaba interrumpido por dos intrones no procesados y la proteína que codificaba se encontraba truncada por un codón de parada prematuro en la fase de lectura. Presumiblemente esta dificultad en la obtención de un ADNc que codificara una proteína SOS1 funcional se origina en una expresión residual del transgén y en la toxicidad de esta proteína de membrana en la bacteria. Este problema se tornó particularmente importante cuando para la transformación de plantas de *Arabidopsis* el ADNc completo de *OsSOS1* fue colocado bajo el control del promotor *CaMV35S* y se transformó en *Agrobacterium*. Aunque no hemos cuantificado el fenómeno, las reorganizaciones plasmídicas se redujeron substancialmente cuando se sustituyó el cloruro sódico del medio de crecimiento bacteriano por cloruro potásico, lo que posiblemente refleja el hecho de que la toxicidad debida a la expresión de *OsSOS1* es mayor en presencia de sus sustratos (Na^+ y H^+).

Los precedentes acerca de proteínas implicadas en la extrusión de Na^+ en plantas son escasos, e inexistentes en arroz. Mediante la expresión heteróloga en la levadura, hemos demostrado que OsSOS1 cataliza el intercambio Na^+/H^+ en vesículas de membrana plasmática derivadas de la cepa de levadura AXT3K, en la cual los genes que codifican las proteínas encargadas del eflujo de Na^+ ENA1-4 y NHA1 han sido inactivados. Aunque estas proteínas

son las responsables de la mayor parte del eflujo de Na^+ que tiene lugar en la membrana plasmática de la levadura y por tanto de la tolerancia celular al Na^+ (Bañuelos *et al.*, 1998), una cierta capacidad de intercambio Na^+/H^+ aún permanece en las vesículas de membranas plasmáticas de la cepa AXT3K en concentraciones de Na^+ superiores a 50 mM (Figura 20). La expresión de *OsSOS1* sólo concede un incremento moderado en el intercambio Na^+/H^+ por encima de la actividad basal. En cambio, la coexpresión del homólogo de arroz *OsSOS1* con el complejo activador SOS2/SOS3 de *Arabidopsis* incrementa significativamente la capacidad de intercambio Na^+/H^+ de las vesículas. Se estimó una K_m aproximada de 29 mM de Na^+ para *OsSOS1* en su estado activado. Esta afinidad aparente parece estar en proporción a la tolerancia salina conferida a las células de levadura por el sistema *OsSOS1/SOS2/SOS3*, que permite el crecimiento en 200 mM NaCl, y es similar a la K_m de 23 mM Na^+ que ha sido estimada para *AtSOS1* en vesículas de membrana plasmática de plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino para inducir así la actividad de *AtSOS1* (Qiu *et al.*, 2003). En consecuencia, la tolerancia salina impartida a la levadura por *OsSOS1* y *AtSOS1* son comparables. En cambio, cuando *OsSOS1* se expresa en el mutante de *Arabidopsis sos1-1* el nivel de supresión fenotípica alcanzado es claramente inferior al que se alcanza cuando el mutante expresa el ADNc de *AtSOS1* en las mismas condiciones de expresión heteróloga. Esta diferencia en la actividad *in planta* podría ser atribuible a funciones alternativas que pueda desempeñar el antiportador *AtSOS1* en relación a la halotolerancia de las plantas de *Arabidopsis* y que sin embargo no estén tan conservadas en monocotiledóneas. Así por ejemplo, se ha demostrado recientemente (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006) que *AtSOS1* interacciona con la proteína CEO1/RCD1, una proteína implicada en la respuesta de las plantas de *Arabidopsis* al estrés oxidativo (Belles-Boix *et al.*, 2000). Aunque la actividad bioquímica de CEO1/RCD1 no está aun clara, su localización es nuclear y parece potenciar la expresión de genes necesarios para la resistencia al estrés oxidativo (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). Actualmente en el laboratorio del Dr. Jian-Kang Zhu se están realizando experimentos encaminados a demostrar la implicación de *SOS1* en la respuesta antioxidante de la planta (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). Es posible por tanto, que la proteína de arroz, *OsSOS1*, expresada heterológamente en plantas de *Arabidopsis* no sea competente, por la disparidad de secuencia, de interaccionar con CEO1/RCD1, u otras proteínas todavía desconocidas, esperandose en este caso una complementación parcial de la mutación *sos1-1* por *OsSOS1* como la observada en este trabajo.

En *Arabidopsis*, la actividad de *SOS1* está regulada positivamente a través de la fosforilación por el complejo kinasa SOS2/SOS3 (Qiu *et al.*, 2002, Quintero *et al.*, 2002). La proteína de arroz también se fosforila y activa por las proteínas de *Arabidopsis* SOS2/SOS3, lo que sugiere que los detalles mecánicos de la regulación bioquímica de *SOS1* están conservados entre estas especies y que, en consecuencia, deben existir homólogos funcionales

de las proteínas SOS2 y SOS3 en arroz. Aunque los genomas completos de las subespecies *Japonica* e *Indica* están aún parcialmente ensamblados, en ambos casos el mismo grupo de 10 CBLs y 30 CIPKs ha sido identificado *in silico* (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). La complejidad de estas familias de genes en arroz, sumada a la existencia en el genoma de *Arabidopsis* de familias de genes de tamaño similar (10 CBLs y 25 CIPKs), sugiere que estos componentes de señalización surgieron y se diversificaron tempranamente en la evolución de las plantas (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Además, puesto que se han encontrado homólogos del transportador SOS1 y de los intermediarios de señalización CIPKs/CBLs en varias especies de plantas evolutivamente distantes (Quintero y Pardo, sin publicar), se podría conjeturar que estas proteínas representaron un importante papel muy tempranamente en la evolución de las plantas. En base a la similitud de secuencias proteínicas, los resultados de los ensayos funcionales en levadura y la complementación genética de mutantes de *Arabidopsis*, hemos aislado candidatos probables a ser los homólogos funcionales del complejo kinasa SOS2/SOS3 en arroz. Las proteínas de arroz OsCIPK24 y OsCBL4 no sólo fueron capaces de activar al transportador de arroz OsSOS1, sino también de intercambiarse con sus equivalentes de *Arabidopsis* para formar complejos proteínicos heterólogos capaces de activar a los antiportadores Na^+/H^+ SOS1 de *Arabidopsis* y arroz. Estos resultados evidencian un alto grado de conservación estructural entre las proteínas SOS de dicotiledóneas y monocotiledóneas. A diferencia con OsSOS1, que es un gen de copia única en arroz, OsCIPK24 y OsCBL4 pertenecen a familias de genes, por lo que sigue siendo una posibilidad formal que otras isoformas de CIPKs y CBLs pudieran haber dado positivo en los ensayos funcionales llevados a cabo en nuestro estudio. Más aún en el caso de OsCBL4, para el cual se presentan al menos otros dos candidatos OsCBL7 y OsCBL8, con una similitud de secuencias elevada y con un dominio de miristoilación aminoterminal. Puesto que las kinasas SnRK3 pueden interaccionar con más de una proteína moduladora CBL/SCaBP (Guo *et al.*, 2001; Kolukisaoglu *et al.*, 2004), queda por demostrar si OsCBL4, OsCBL7 y/o OsCBL8 son funcionalmente redundantes. En cualquier caso para obtener conclusiones definitivas acerca de la función y especificidad de estas isoformas e identificar de manera inequívoca aquellas isoformas de CBLs y CIPKs que son relevantes para la halotolerancia será necesaria la determinación del patrón de expresión y localización subcelular de cada una de ellas, además del análisis fenotípico de mutantes en estos genes. El creciente número de mutantes de inserción que están siendo anotados en arroz permitirá en un futuro no muy lejano esta aproximación genética.

Los tricomas radicales y las células epidérmicas son los sitios principales de control de la toma de iones inorgánicos que entran en la raíz por la vía simplástica. Adicionalmente, los iones y solutos se mueven apoplásticamente a través del cortex llevados por el flujo de agua absorbida por la raíz hasta que alcanzan la barrera endodérmica que previene su difusión pasiva

a la vasculatura, obligando a la absorción selectiva de iones a través del simplasto en las células del cortex y la endodermis. En ambientes salinos, la vía celular imparte una mayor selectividad en la toma de iones que el flujo de agua e iones a lo largo de la vía apoplástica de la raíz. La contribución relativa de cada una de estas vías de absorción al flujo neto de agua y solutos depende de factores ambientales, entre ellos la salinidad (Steudle y Peterson, 1998; De Boer y Volkov, 2003). Típicamente, bajo condiciones de estrés salino la ruta apoplástica se reduce por un proceso que implica la lignosuberización de los tejidos de la raíz (Azaizeh y Steudle, 1991; Cruz *et al.*, 1992; Sanchez-Aguayo *et al.*, 2004). En base a este modelo general, se ha sugerido que la absorción de Na^+ en raíces de arroz tiene lugar principalmente a través del flujo de desvío apoplástico y su derrame al xilema a través de discontinuidades en la barrera endodérmica de la raíz (Yeo *et al.*, 1987; Yadav *et al.*, 1996). En consecuencia, se ha sugerido que la absorción de Na^+ en el arroz en condiciones de estrés salino estaría controlada por genes que afectan a la anatomía de la raíz más que a procesos de transporte membranal (Koyama *et al.*, 2001). En cualquier caso, incluso si el flujo apoplástico incontrolado fuera la principal ruta de entrada de Na^+ al cilindro vascular de la raíz, un mecanismo enzimático para el eflujo de Na^+ sería aún de importancia crítica para minimizar la absorción neta celular de Na^+ en los tejidos que rodean los haces vasculares de la planta. El antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática SOS1, podría probablemente desempeñar este papel y así prevenir el daño celular, contribuyendo a la tolerancia salina de la planta completa, particularmente en niveles de salinidad moderados que no ocasionan un fallo fisiológico catastrófico. Una baja concentración de sales podría en sí misma no ser dañina para el arroz (Yeo *et al.*, 1991); es el aumento progresivo en la concentración interna de Na^+ la que llevan al daño celular y a la parada del crecimiento (Munns, 1993). Siempre y cuando el crecimiento se sostenga para mantener la concentración de sales en el tejido foliar baja por dilución, se podría evitar un daño celular significativo, pues es la acumulación a largo plazo de sales en la hoja es la causa final del envenenamiento por sales (Flowers *et al.*, 1991).

Se ha demostrado que la capacidad de las variedades más halotolerantes de arroz para reducir la acumulación de Na^+ depende de la concentración de K^+ en el medio de crecimiento. En un rango de concentraciones de K^+ que van desde micromolar alto a milimolar bajo, las variedades halotolerantes *Pokkali* y *BK* excluyen el Na^+ selectivamente manteniendo la concentración de K^+ interna relativamente constante. En cambio, cuando los niveles de K^+ se encuentran en un nivel micromolar bajo, estas variedades acumulan Na^+ de manera similar a la variedad halosensible *IR29* (Golldack *et al.* 2002; Golldack *et al.* 2003). La medida fisiológica de la toma de iones en raíces de arroz apunta a la existencia de sistemas independientes de absorción de alta afinidad de K^+ y Na^+ que podrían estar mediados por los transportadores HAK/KUP y HKT, respectivamente (Garcia-deblas *et al.*, 2003). La isoforma de arroz OsHKT1

se expresa en células epidérmicas y corticales de la raíz (Golldack *et al.*, 2002) y sus parámetros cinéticos son similares a los exhibidos por la raíz completa (entrada de Na⁺ de alta afinidad que se bloquea por K⁺), en tanto que la isoforma OsHKT4 se expresa en el tallo y media una entrada rápida de Na⁺ de baja afinidad en levaduras (Garcia-deblas *et al.*, 2003). Recientemente, un QLT mayor implicado en la regulación de los contenidos de K⁺ en la parte aérea y en la halotolerancia en arroz, ha permitido la identificación del gen *SKC1* que codifica una proteína tipo HKT que se corresponde con el gen *OsHKT8* (Garcia-deblas *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005). *SKC1/HKT8* se expresa preferentemente en las células parenquimáticas que rodean a los vasos del xilema y se induce por el estrés salino (Ren *et al.*, 2005). En ensayos electrofisiológicos, la isoforma SCK1/HKT8 de la variedad relativamente halotolerante *Nona Bokra*, resultó ser más activa en el transporte de Na⁺ a través de la membrana plasmática, que su equivalente de la variedad halosensible *Koshihiraki*, lo que sugiere que la mayor capacidad de recuperación de Na⁺ del xilema por SCK1/HKT8 en las plantas de *Nona Bokra* representa la base de su halotolerancia. Inversamente, una mayor concentración de Na⁺ en el xilema y hojas se ha asociado a un alelo *SKC1* débil en la variedad halosensible *Koshihiraki*. En conjunto, estos resultados son consistentes con un transporte de Na⁺ facilitado en condiciones salinas, particularmente con niveles bajos de K⁺, y apoyan el concepto de que los sistemas de transporte iónico y su capacidad de discriminación entre Na⁺ y K⁺ son de relevancia fisiológica para la tolerancia salina del arroz. Se deduce también que los mecanismos que restringen el contenido neto de Na⁺, incluyendo el eflujo activo en la membrana plasmática encargado de contrarrestar la carga de iones, serían determinantes para la tolerancia salina. Una evaluación precisa de la importancia relativa de SOS1 en la tolerancia salina del arroz debe esperar a la disponibilidad de mutantes nulos o líneas de interferencia de ARN.

En el curso de este trabajo hemos observado un interesante contraste en la actividad que exhiben en la levadura dos versiones de la kinasa de arroz OsCIPK24, cuya única diferencia estriba en la metionina de inicio de la transcripción, distanciadas entre sí por únicamente seis residuos. La versión de OsCIPK24 que inicia la transcripción anteriormente en la UTR, y que por lo tanto codifica una kinasa seis residuos más larga en el extremo aminoterminal, exhibe una actividad prácticamente nula en la activación del antiportador OsSOS1, tanto en su forma truncada (OsCIPK24Δ315) como en la versión de longitud completa en presencia del regulador OsCBL4. En cambio la versión más corta de la kinasa que inicia la traducción en el segundo ATG a partir del extremo 5' del ADNc, y que por lo tanto contiene seis residuos menos en la región aminoterminal de la kinasa, parece codificar una kinasa funcional con una actividad muy parecida a la de su homólogo de *Arabidopsis* SOS2, tanto en la versión truncada (OsCIPK24Δ309), como la versión completa en presencia de OsCBL4. Es posible que estos primeros seis aminoácidos modifiquen sustancialmente el plegamiento normal del dominio

kinasa bloqueando con ello su actividad, tanto en la kinasa completa en presencia de OsCBL4 como en la kinasa hiperactiva OsCIPK24 Δ 315. Aunque no disponemos por el momento de datos experimentales que demuestren esta afirmación, este fenómeno confirma la relevancia del extremo aminoterminal de la kinasa en la funcionalidad de los CIPKs pues además de regular la especificidad de la interacción con las proteínas CBL (Kim *et al.*, 2000) parece tener una importancia crítica en la actividad del dominio kinasa, a juzgar por la falta de actividad de la proteína trunca OsCIPK24 Δ 315 que, en principio, sería independiente de OsCBL4.

VI. CONCLUSIONES

1. El mecanismo de activación del antiportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis* SOS1 por la kinasa AtSOS2 consiste en la fosforilación del residuo de serina en la posición 1138, aunque la serina 1136 forma parte del dominio de reconocimiento y es esencial para fosforilación del extremo carboxiterminal de la proteína SOS1. La sustitución de una o ambas dianas de fosforilación por residuos no fosforilables de alanina incapacita a dicho dominio para su reconocimiento y fosforilación por SOS2 y genera una proteína SOS1 con una actividad antiportadora Na^+/H^+ basal normal pero que no puede ser activada por SOS2.

2. El sistema SOS de halotolerancia descrito previamente en la especie dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* está conservado en la especie monocotiledónea *Oryza sativa* y cada uno de los miembros que lo conforman presenta una homología tal en ambos organismos, arroz y *Arabidopsis*, que los hace funcionalmente intercambiables entre sí. La proteína de arroz, *OsSOS1*, codificada por el locus Os12g44360 en el cromosoma XII es el homólogo funcional del antiportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis* AtSOS1. Los genes de arroz *OsCIPK24* y *OsCBL4* son respectivamente los homólogos funcionales de la proteína kinasa SOS2 y del sensor de calcio SOS3 de *Arabidopsis thaliana*.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Adams P., Nelson D.E., Yamada S., Chmara W., Jensen R.G., Bohnert H.J. y Griffiths H.** (1998) Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum*. (Aizoaceae) *New Phytol.* **138**: 171-179.
- Albrecht V., Ritz O., Linder S., Harter K., Kudla J.** (2001) The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca⁺⁺-regulated kinases. *EMBO J.* **20**: 1051-1063.
- Albrecht V., Weigl S., Blazevic D., D'Angelo C., Batistic O., Kolukisaoglu U., Bock R., Schulz B., Harter K., Kudla J.** (2003) The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *Plant J.* **36**: 457-470.
- Alia, Hayashi H., Sakamoto A., Murata N.** (1998) Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J.* **16**: 155-161.
- Allakhverdiev S.I., Sakamoto A., Nishiyama Y., Inaba M., Murata N.** (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* **123**: 1047-1056.
- Allen R.D., Webb R.P., Schake S.A.** (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med.* **23**: 473-479.
- Amaya I., Botella M.A., de la Calle M., Medina M.I., Heredia A., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Quesada M.A. y Valpuesta V.** (1999) Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.* **457**: 80-84.
- Amtmann A., Jelitto T.C., Sanders D.** (1999) K⁺-Selective inward-rectifying channels and apoplastic pH in barley roots. *Plant Physiol.* **120**: 331-338.
- Apel K., Hirt H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373-399.
- Apse M.P., Sottosanto J.B. y 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.
- Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E.** (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256-1258.
- Asada K., Takahashi M.** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: *Photoinhibition* Eds. DJ Kyle, CB Osborne, CJ Arntzen, Elsevier, Amsterdam pp. 227-287.
- Assante G., Merlini L. y Nasini G.** (1977) (+)-Abscisic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola*. *Experientia.* **33**: 1556-1565.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K.** (1996). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.
- Azaizeh H., Steudle E.** (1991) Effects of Salinity on Water Transport of Excised Maize (*Zea mays* L.) Roots. *Plant Physiol.* **97**: 1136-1145.

- Ball K.L., Barker J., Halford N.G., Hardie D.G.** (1995) Immunological evidence that HMG-CoA reductase kinase-A is the cauliflower homologue of the RKIN1 subfamily of plant protein kinases. *FEBS Lett.* **377**: 189-192.
- Bañuelos M.A., Sychrová H., Bleykasten-Grosshans C., Souciet J.L., Potier. S.** (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**: 2749-2758.
- Batistic O., Kudla J.** (2004) Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* **219**: 915-924.
- Bechtold N., Ellis J. y Pelletier G.** (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. (Paris) **316**: 1194–1199.
- Belles-Boix E., Babiychuk E., Van Montagu M., Inze D., Kushnir S.** (2000) CEO1, a new protein from *Arabidopsis thaliana*, protects yeast against oxidative damage. *FEBS Lett.* **482**: 19-24.
- Benito B., Rodriguez-Navarro A.** (2003) Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **36**: 382-389.
- Berger J.** (1987) Guide to molecular cloning techniques. Ed. Elsevier pp.152.
- Berthomieu P., Conejero G., Nublat A., Brackenbury W.J., Lambert C., Savio C., Uozumi N., Oiki S., Yamada K., Cellier F., Gosti F., Simonneau T., Essah P.A., Tester M., Verry A.A., Sentenac H. y Casse F.** (2003) Functional analysis of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBOJ.* **22**: 2004-2014.
- Bijlmakers M.J., Marsh M.** (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.* **13**: 32-42.
- Binzel M.L., Hasegawa P.M., Handa A.K., Bressan R.A.** (1985) Adaptation of Tobacco Cells to NaCl. *Plant Physiol.* **79**: 118-125.
- Blumwald E.** (2003) Engineering salt tolerance in plants. *Biotech. Gen. Engineering Rev.* **20**: 261-275.
- Blumwald E.** (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 **12**:431-434.
- Blumwald E., Aharon G.S. y Apse M.P.** (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**:140-151.
- Bohnert H.J., Nelson D.E. y Jensen R.G.** (1995) Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell.* **7**: 1099-1111.
- Bolker J.A.** (1995) Model systems in developmental biology. *Bioessays.* **17**: 451-455.
- Borsani O., Valpuesta V. y Botella M.A.** (2003) Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *PCTOC* **73**: 101-115.
- Borsani O., Cuartero J., Fernandez J.A., Valpuesta V. y Botella M.A.** (2001a) Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *Plant Cell.* **13**: 873-887.

- Borsani O., Valpuesta V., Botella M.A.** (2001b) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* **126**: 1024-1030.
- Boston R.S., Viitanen P.V., Vierling E.** (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* **32**:191-222.
- Bowler C., Van Montagu M. y Inze D.** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 83-116.
- Bradford M.M.** (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.
- Bray E.A.** (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot.* **55**: 2331-2341.
- Bray E.A.** (2002) Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann Bot* **89**: 803-811.
- Bray E.A.** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* **2**: 48-54.
- Bray E.A.** (1993) Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol.* **103**: 1035-1040.
- Bressan R.A., Zhang C., Zhang H., Hasegawa P.M., Bohnert H.J. y Zhu J.-K.** (2001) Learning from the *Arabidopsis* experience. The next gene search paradigm. *Plant Physiol.* **127**: 1354-1360.
- Bressan R.A., Nelson D.E., Iraki N.M., LaRosa P.C., Singh N.K., Hasegawa P.M. y Carpita N.C.** (1990) Reduced cell expansion and changes in cell walls of plant cells adapted to NaCl. En: *Environmental injury to plants*. Ed. Kattermann F. Academic Press, New York pp. 137-171.
- Brett C.L., Donowitz M., Rao R.** (2005) Evolutionary origins of eukaryotic sodium /proton exchangers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**: C223-239.
- Brunelli J.P., Pall M.L.** (1993) A series of yeast/*Escherichia coli* lambda expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and cre/lox-mediated plasmid excision. *Yeast* **9**:1309-1318.
- Bullock W.O., Fernández J.M., y Short J.M.** (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotech.* **5**: 376-379.
- Burgoyne R.D., Weiss J.L.** (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca⁺⁺-binding proteins. *Biochem. J.* **353**: 1-12.
- Bush D.S.** (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 95-122.
- Carden D.E., Walker D.J., Flowers T.J., Miller A.J.** (2003) Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiol.* **131**: 676-683.

- Robertson M., Chandler P.M.** (1994) A dehydrin cognate protein from pea (*Pisum sativum* L.) with an atypical pattern of expression. *Plant Mol Biol.* **26**: 805-816.
- Chandra B.R., Zhang J., Blum A., Hod T.H.D., Wue R., Nguyen H.T.** (2004) HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci.* **166**: 855-862.
- Chen T.H., Murata N.** (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 250-257.
- Chen X., Chang M., Wang B., Wu B.** (1997) Cloning of a Ca⁺²-ATPase gene and the role of cytosolic Ca⁺⁺ in the gibberellin-dependent signaling pathway in aleurone cells. *Plant J.* **11**: 363-371.
- Cheng N.H., Pittman J.K., Zhu J.-K., Hirschi K.D.** (2004) The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H⁺/Ca⁺⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J. Biol. Chem.* **279**: 2922-2926.
- Cheng N.H., Pittman J.K., Shigaki T., Hirschi K.D.** (2002) Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H⁺/cation antiporter. *Plant Physiol.* **128**:1245-1254.
- Cherel I., Michard E., Platet N., Mouline K., Alcon C., Sentenac H., Thibaud J.B.** (2002) Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K⁺ channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* **14**: 1133-1146.
- Chinnusamy V., Schumaker K. y Zhu J.-K.** (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.* **55**: 225-236.
- Choi H., Hong J., Ha J., Kang J., Kim S.Y.** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* **275**: 1723-1730.
- Conklin P.L., Williams E.H., Last R.L.** (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 9970-9974.
- Cruz R.T., Jordan W.R. and Drew M.C.** (1992) Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiol.* **99**: 203-212.
- Custodio E.** (1983) Hidrología Subterránea. Ed. Omega- Barcelona.
- Dale S., Wilson W.A., Edelman A.M., Hardie D.G.** (1995) Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett.* **361**: 191-195.
- Darley C.P., van Wuytswinkel O.C., van der Woude K., Mager W.H., de Boer A.H.** (2000) *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochem. J.* **351**: 241-249.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F.** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 779-795.
- De Boer A.H. y Volkov V.** (2003) Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. *Plant Cell Environ.* **26**: 87-101.

- Delauny A.J. y Verma D.P.S.** (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* **4**: 215-223.
- Delcasso-Tremousaygue D., Grellet F., Panabieres F., Ananiev E.D. y Delseny M.** Structural and transcriptional characterization of the external spacer of a ribosomal RNA nuclear gene from a higher plant. (1988) *Eur. J. Biochem.* **172**: 767-776.
- Demidchik V., Davenport R.J. y Tester M.** (2002) Nonselective cation channels in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **53**: 67-107.
- Demidchik V. y Tester M.** (2002) Sodium fluxes through nonselective cation in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* **128**: 379-387.
- Desikan R., A-H-Mackerness S., Hancock J.T., Neill S.J.** (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* **127**: 159-172.
- Diamant S., Eliahu N., Rosenthal D., Goloubinoff P.** (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J. Biol. Chem.* **276**: 39586-39591.
- Ding L., Zhu J.-K.** (1997) Reduced Na⁺ uptake in the NaCl-hypersensitive *sos1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **113**: 795-799.
- Dreyer I., Horeau C., Lemaillet G., Zimmermann S., Bush D.R., Rodríguez-Navarro A., Schachtman D.P., Spalding E.P., Sentenac H. y Gaber R.F.** (1999) Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems *J. Exp. Bot.* **50**: 1073-1087.
- Elble R.** (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeast. *BioTechniques* **13**: 18-20.
- Epstein E.** (1998) How calcium enhances plant salt tolerance. *Science* **280**: 1906-1907.
- Epstein E.** (1961) The essential role of calcium in selective cation transport by Plant Cells. *Plant Physiol.* **36**: 437-444.
- Essah P.A., Davenport R., Tester M.** (2003) Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 307-318.
- Farazi T.A., Waksman G., Gordon J.I.** (2001) The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* **276**: 39501-39504.
- Flowers T.J.** (2004) Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* **55**: 307-319.
- Flowers T.J., Hajibagher M.A., Yeo A.R.** (1991). Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant Cell Environ.* **1**: 319-325.
- Flowers T.J., Flowers S.A., Hajibagheri M.A., Yeo A.R.** (1990) Salt Tolerance in the Halophytic Wild Rice *Porteresia coarctata* cv *Tateoka*. *New Phytologist* **114**: 675-684.
- Flowers T.J., Hajibagheri M.A. y Clipson N.J.W.** (1986) Halophytes. *The Quarterly Rev. Biol.* **61**: 313-337.

- Flowers T.J., Troke P.F. y Yeo A.R.** (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. PlantPhysiol.* **28**: 89-121.
- Foolad M.R., Zhang L.P. y Lin G.Y.** (2001) Identification and validation of QTLs for salt tolerance during vegetative growth in tomato by selective genotyping. *Genome* **44**: 444-454.
- Fukuda A., Chiba K., Maeda M., Nakamura A., Maeshima M., Tanaka Y.** (2004) Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley. *J. Exp. Bot.* **55**: 585-594.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* **1**:151-158.
- Garciadeblas B., Senn M.E., Banuelos M.A., Rodriguez-Navarro A.** (2003) Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* **34**: 788-801.
- Gassman W., Rubio F. y Schroeder J.I.** (1996) Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J.* **10**: 869-882.
- Gaxiola R.A., Li J., Undurraga S., Dang L.M., Allen G.J., Alper S.L. y Fink G.R.** (2001) Drought- and salt tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 11444-11449.
- Gaxiola R.A., Rao R., Sherman A., Grisafi P., Alper S.L., Fink G.R.** (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and AVP1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 1480-1485.
- Gaxiola R., Larrinoa I.F., Villalba J.M., Serrano R.** (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt-tolerance in yeast. *EMBO J.* **11**: 3157-3164.
- Gaymard F., Pilot G., Lacombe B., Bouchez D., Bruneau D., Boucherez J., Michaux-Ferriere N., Thibaud J.B., Sentenac H.** (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell.* **94**: 647-655.
- Gietz R.D. y Woods R.A.** (2002) Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Methods Enzymol.* **350**: 87-96.
- Gilroy S., Trewavas A.** (2001) Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 307-314.
- Gisbert C., Rus A.M., Bolarin M.C., Lopez-Coronado J.M., Arrillaga I., Montesinos C., Caro M., Serrano R., Moreno V.** (2000) The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol.* **123**: 393-402.
- Gobert A., Park G., Amtmann A., Sanders D., Maathuis F.J.** (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., Quigley F., Michalowski C.B., Kamasani U.R., Bohnert H.J.** (2003) Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. *Plant Mol Biol.* **51**: 71-81.

- Golldack D., Su H., Quigley F., Kamasani U.R., Munoz-Garay C., Balderas E., Popova O.V., Bennett J., Bohnert H.J., Pantoja O.** (2002) Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *Plant J.* **31**: 529-542.
- Gomez J.M., Hernandez J.A., Jimenez A., del Rio L.A., Sevilla F.** (1999) Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radic Res.* **31**: S11-18.
- Gong D., Gong Z., Guo Y., Chen X., Zhu J.-K.** (2002a) Biochemical and functional characterization of PKS11, a novel *Arabidopsis* protein kinase. *J. Biol. Chem.* **277**: 28340-28350.
- Gong D., Gong Z., Guo Y., Zhu J.-K.** (2002b) Expression, activation, and biochemical properties of a novel *Arabidopsis* protein kinase. *Plant Physiol.* **129**: 225-234.
- Gong D., Guo Y., Jagendorf A.T., Zhu J.-K.** (2002c) Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol.* **130**: 256-264.
- Gould K.L., Moreno S., Owen D.J., Sazer S., Nurse P.** (1991) Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34cdc2 function. *EMBO J.* **10**: 3297-3309.
- Greenway H. y Munns R.** (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.
- Gultinan M.J., Marcotte W.R. Jr., Quatrano R.S.** (1990) A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science.* **250**: 267-271.
- Guo Y., Qiu Q.S., Quintero F.J., Pardo J.M., Ohta M., Zhang C., Schumaker K.S., Zhu J.-K.** (2004) Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* **16**: 435-449.
- Guo Y., Xiong L., Song C.P., Gong D., Halfter U., Zhu J.-K.** (2002) A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell.* **3**: 233-244.
- Guo Y., Halfter U., Ishitani M. y Zhu J.-K.** (2001) Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**: 1383-1400.
- Guthrie C., Fink G.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* **194**: 795-823.
- Halfter U., Ishitani M. y Zhu, J.-K.** (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3735-3740.
- Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell.* **8**: 1773-1791.
- Harding S.A., Oh S.H., Roberts D.M.** (1997) Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO J.* **16**: 1137-1144.

- Hare P.D., Cress W.A. y Van Staden J.** (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* **21**: 535-554.
- Haro R., Garcíadeblas B., Rodríguez-Navarro A.** (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* **291**: 189-191.
- Harper J.F., Breton G., Harmon A.** (2004) Decoding Ca⁺⁺ signals through plant protein kinases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 263-288.
- Harper J.F., Hong B., Hwang I., Guo H.Q., Stoddard R., Huang J.F., Palmgren M.G., Sze H.** (1998) A novel calmodulin-regulated Ca⁺⁺ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* **273**: 1099-1106.
- Hartl F.U.** (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* **381**: 571-579.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **51**: 463-499.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Nelson D.E., Samaras Y., Rhodes D.** (1994). Tissue culture in the improvement of salt tolerance in plants. En: *Soil mineral stresses - Approaches to crop improvement. Monographs on Theoretical and Applied Genetics.* Eds. Yeo A.R., Flowers T.J., Springer-Verlag, Berlin pp. 83-125.
- Hayashi H., Alia, Mustardy L., Deshnum P., Ida M., Murata N.** (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the codA gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* **12**: 133-142.
- Hendrick J.P., Hartl F.U.** (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev. Biochem.* **62**: 349-384.
- Hernandez J.A., Olmos E., Corpas F.J., Sevilla F., del Río L.A.** (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* **105**: 151-167.
- Hirsch R.E., Lewis B.D., Spalding E.P., Sussman M.R.** (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**: 918-921.
- Holsters M., Waele D.D., Depicker A., Messens E., Montagu M.V. y Schell J.** (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **163**: 181-187.
- Hong B., Barg R., Ho T.H.** (1992) Developmental and organ-specific expression of an ABA- and stress-induced protein in barley. *Plant Mol. Biol.* **18**: 663-674.
- Horie T., Yoshida K., Nakayama H., Yamada K., Oiki S., Shinmyo A.** (2001) Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* **27**: 129-138.
- Hrabak E.M., Chan C.W., Gribskov M., Harper J.F., Choi J.H., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H.G., Sussman M.R., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J.-K., Harmon A.C.** (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* **132**: 666-680.
- Hua B.G., Mercier R.W., Leng Q., Berkowitz G.A.** (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 J., Hirji R., Adam L., Rozwadowski K.L., Hammerlindl J.K., Keller W.A., Selvaraj G.** (1993) Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* **122**: 747-756.
- Huang L., Berkelman T., Franklin A.E., Hoffman N.E.** (1993) Characterization of a gene encoding a Ca⁺⁺-ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 10066-10070.
- Hurley J.H., Dean A.M., Sohl J.L., Koshland D.E. Jr., Stroud R.M.** (1990) Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* **249**: 1012-1016.
- Hwang Y.S., Bethke P.C., Cheong Y.H., Chang H.S., Zhu T., Jones R.L.** (2005) A gibberellin-regulated calcineurin B in rice localizes to the tonoplast and is implicated in vacuole function. *Plant Physiol* **138**: 1347-1358
- Inoue H., Nojima H., Okayama H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ishitani M., Liu J., Halfter U., Kim C.S., Shi W., Zhu J.-K.** (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* **12**: 1667-1678.
- Jeschke W.D.** (1984) K⁺-Na⁺ exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. En: *Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement*. Eds. John Wiley and Sons, Staples RC, New York pp. 37-66.
- Jolivet Y., Larher F., Hamelin J.** (1982) Osmoregulation in halophytic higher plants: The protective effect of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci Lett* **25**: 193-201.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., 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.
- Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Kim K., Agarwal M., Fu X., Huang A., Zhu J.K.** (2006) The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci*.
- Kim K.N., Cheong Y.H., Gupta R., Luan S.** (2000) Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol.* **124**: 1844-1853.
- Kishor P., Hong Z., Miao G.H., Hu C., Verma D.** (1995) Overexpression of [delta]-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant Physiol.* **108**: 1387-1394.
- Kitagawa Y., Yamamoto H. y Oritani T.** (1995) Biosynthesis of abscisic acid in the fungus *Cercospora cruenta*: Stimulation of biosynthesis by water stress and isolation of a transgenic mutant with reduced biosynthetic capacity. *Plant Cell Physiol.* **36**: 557-564.
- Knight H.** (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* **195**: 269-324.
- Knight H., Knight M.R.** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* **6**: 262-267.

- Knight, Z.A., Schilling B., Row R.H., Kenski D.M., Gibson B.W., Shokat K.M.** (2003) Phosphospecific proteolysis for mapping sites of protein phosphorylation. *Nature Biotech.* **21**: 1396-1396.
- Kohorn B.D.** (2001) WAKs; cell wall associated kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 529-533.
- Kolukisaoglu U., Weinel S., Blazevic D., Batistic O., Kudla J.** (2004) Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol.* **134**: 43-58.
- Koncz C. y J. Schell** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5' controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 383-396.
- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 2940-2945.
- Koyama M.L., Levesley A., Koebner R.M., Flowers T.J., Yeo A.R.** (2001) Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiol.* **125**: 406-422.
- Kudla J., Xu Q., Harter K., Gruissem W., Luan S.** (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 4718-4723.
- Läuchli A.** (1990) Calcium, salinity and plasma membrane. En: *Calcium in Plant Growth and Development*. Eds. Leonard R.T.y . Kepler P.K. American Society of *Plant Physiologists*, Rockville MD., pp. 26-35.
- Lee J.Y., Yoo B.C., Harmon A.C.** (1998) Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochemistry.* **37**: 6801-6809.
- Leng Q., Mercier R.W., Hua B.G., Fromm H., Berkowitz G.A.** (2002) Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol.* **128**: 400-410.
- Leung J. y Giraudat J.** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 199-222.
- Lewit-Bentley A., Rety S.** (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 637-643.
- Li J., Lee Y.R., Assmann S.M.** (1998) Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol.* **116**: 785-795.
- Li L., Kim B.G., Cheong Y.H., Pandey G.K., Luan S.** (2006) A Ca⁺⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 12625-12630.
- Li Q.L., Gao X.R., Yu X.H., Wang X.Z., An L.J.** (2003) Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1431-1436.
- Liang F., Cunningham K.W., Harper J.F., Sze H.** (1997) ECA1 complements yeast mutants defective in Ca⁺⁺ pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca⁺⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 8579-8584.

- Lilius G., Holmberg N. y Bülow L.** (1996) Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Biotechnology* **14**: 177-180.
- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C.-S. y Zhu J.-K.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3703-3734.
- Liu J., Zhu J.-K.** (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*. **280**: 1943-1945.
- Liu J., Zhu J.-K.** (1997) An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci.* **94**: 14960–14964
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., 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.
- Llorente F., Oliveros J.C., Martínez-Zapater J.M. y Salinas J.** (2000) A freezing-sensitive mutant of *Arabidopsis*, *frs1*, is a new *aba3* allele. *Planta*. **211**: 648-655.
- Luan S., Kudla J., Rodriguez-Concepcion M., Yalovsky S., Gruissem W.** (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*. **14**: S389-400.
- Maathuis F.J., Sanders D.** (2001). Sodium uptake in *Arabidopsis thaliana* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol.* **127**: 1617-1625.
- Maathuis F.J. y Amtmann A.** (1999) K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann Bot* **84**: 123-133.
- Maathuis F.J., Verlin D., Smith F.A., Sanders D., Fernandez J.A., Walker N.A.** (1996) The physiological relevance of Na⁺-coupled K⁺-transport. *Plant Physiol.* **112**: 1609-1616.
- Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A., Schmid J., Lawton K.A., Dangl J.L., Dietrich R.A.** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* **26**: 403-410.
- Mani S., Van De Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N.** (2002) Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **128**: 73-83.
- Marcum, K.B.** (1999) Salinity tolerance mechanisms of grasses in the subfamily chloridoideae. *Crop Sci.* **39**: 1153–1160.
- Martinez-Atienza, J., Xingyu, J., Garcíadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.-K., Pardo, J.M., Quintero, F.J.** (2006) Conservation of the SOS pathway for salt-tolerance in rice. *Plant Physiol.*
- Mäser P., Eckelman B., Vaidyanathan R., Horie T., Fairbairn D.J., Kubo M., Yamagami M., Yamaguchi K., Nishimura M., Uozumi N., Robertson W., Sussman M.R. y Schroeder J.I.** (2002) Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Lett.* **531**: 157-161.

- Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., Ward J.M., Hirschi K., Sze H., Talke I.N., Amtmann A., Maathuis F.J., Sanders D., Harper J.F., Tchiew J., Gribskov M., Persans M.W., Salt D.E., Kim S.A. y Guerinot M.L.** (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**: 1646–1667.
- McAinsh M.R., Hetherington A.M.** (1998) Encoding specificity in Ca⁺⁺ signalling systems. *Trends Plant Sci.* **3**: 32-36.
- McCue K.F. y Hanson A.D.** (1990) Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* **8**: 358-362.
- Mendoza I., Quintero F.J., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Pardo J.M.** (1996) Activated calcineurin confers high tolerance to ion stress and alters the budding pattern and cell morphology of yeast cells. *J Biol. Chem.* **271**: 23061-23067.
- Mendoza I., Rubio F., Rodriguez-Navarro A., Pardo J.M.** (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem.* **269**: 8792-8796.
- Menendez A., Larsson C., Ugalde U.** (1995) Purification of functionally sealed cytoplasmic side-out plasma membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem.* **230**: 308-314.
- Mennen H., Jacoby B., Marschner H.** (1990) Is sodium proton antiport ubiquitous in plant cells? *J. Plant Physiol.* **137**: 180-183.
- Mitchell D.A., Marshall, T.K. y Deschenes, R.J.** (1993) Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* **9**: 715–722.
- Miyamoto N., Steudle E., Hirasawa T. y Lafitte R.** (2001) Hydraulic conductivity of rice roots. *J. Exp. Bot.* **362**: 1835-1846.
- Mohanty A., Kathuria H., Ferjani A., Sakamoto A., Mohanty P., Murata N., Tyagi A.K.** (2002) Transgenics of an elite indica rice variety *Pusa Basmati 1* harbouring the *codA* gene are highly tolerant to salt stress. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 51-57.
- Moran J.F., Becana M., Iturbe-Ormatexe I., Fecilla S., Klucas R.V. y Aparicio-Tejo P.** (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta.* **194**: 346-352.
- Mumberg D., Muller R., Funk M.** (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122.
- Munns R.** (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* **167**: 645-663.
- Munns R.** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **25**: 239-250.
- Munns R.** (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* **16**: 15-24.
- Munns R., Husain S., Rivelli A.R., James R., Condon A.G., Lindsay M., Lagudah E., Schachtman D. y Hare R.** (2002) Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically-based selection traits. *Plant Soil* **247**: 93-105.

- Munns R. y Termaat A.** (1986) Whole-plant responses to salinity. *Austr. J. Plant Physiol.* **13**:143-160.
- Murashige Y., y Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**: 473-497.
- Murray H.G. y Thompson W.F.** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4321-4325.
- Nagae M., Nozawa A., Koizumi N., Sano H., Hashimoto H., Sato M., Shimizu T.** (2003) The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**: 42240-42246.
- Nakamura T., Liu Y., Hirata D., Namba H., Harada S., Hirokawa T., Miyakawa T.** (1993). Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.* **12**: 4063-4071.
- Nambara E., Marion-Poll A.** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 165-185.
- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (1999) Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **461**: 205-210.
- Narusaka Y., Nakashima K., Shinwari Z.K., Sakuma Y., Furihata T., Abe H., Narusaka M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.* **34**: 137-148.
- Nass R., Cunningham K.W., Rao R.** (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na^+/H^+ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**: 26145-26152.
- Neill S., Horgan R., Walton D. y Lee T.** (1982) The biosynthesis of abscisic-acid in *Cercospora rosicola*. *Phytochemistry* **21**: 61-65.
- Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M. y Pardo J.M.** (1995) Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *PlantPhysiol.* **109**: 735-742.
- Noctor G., Foyer C.H.** (1998) Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 249-279.
- Ohta M., Guo Y., Halfter U., Zhu J.-K.** (2003) A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 11771-11776.
- Ohta M., Hayashi Y., Nakashima A., Hamada A., Tanaka A., Nakamura T. y Hayakawa T.** (2002) Introduction of a Na^+/H^+ antiporter gene from *Atriplex gemelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett.* **532**: 279-282.
- Oldeman L.R., Hakkeling R.T.A., Sombroek W.G.** (1991) 2d Ed. World map of the status of human-induced soil degradation: an explanatory note. United Nation Environment Programme, Nairobi.

- Pandey G.K., Cheong Y.H., Kim K.N., Grant J.J., Li L., Hung W., D'Angelo C., Weinl S., Kudla J., Luan S.** (2004) The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1912-1924.
- Pardo J.M., Cubero B., Leidi E.O., Quintero F.J.** (2006) Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **57**:1181-1199.
- Pardo J.M., Martínez-Atienza J., Quintero F.J.** (2005) Function of the SOS system on the salinity tolerance of plants. Society of Experimental Biology, Barcelona.
- Pardo J.M., Reddy M.P., Yang S., Maggio A, Huh G.H., Matsumoto T., Coca M.A., Koiwa H., Yun D.J., Wataid A.A., Bressan R.A., Hasegawa P.M.** (1998). Stress signaling through Ca^{++} /calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 9681-9686.
- Parida A.K., Das A.B.** (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **60**: 324-349.
- 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.
- Pittman J.K., Shigaki T., Cheng N.H., Hirschi K.D.** (2002) Mechanism of N-terminal autoinhibition in the *Arabidopsis* Ca^{++}/H^+ antiporter CAX1. *J. Biol. Chem.* **277**: 26452-26459.
- Polle A.** (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modelling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* **126**: 445-462.
- Polle A.** (1997) Defense against photooxidative damage in plants. En: *Oxidative stress and molecular biology of antioxidants defences*. Ed. Scandalios JG Cold Spring Harbor Laboratories pp. 623-666.
- Putney L.K., Denker S.P., Barber D.L.** (2002) The changing face of the Na^+/H^+ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**: 527-552.
- Qiu Q.S., Guo Y., Dietrich M.A., Schumaker K.S. y Zhu J.-K.** (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 8436-8441.
- Quintero F.J., Ohta M., Shi H., Zhu J.-K. y Pardo J.M.** (2002) Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na^+ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 9061-9066.
- Quintero F.J., Blatt M.R., Pardo J.M.** (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na^+/H^+ antiporters. *FEBS Lett.* **471**: 224-228.
- Rains D.W. y Epstein E.** (1967) Sodium absorption by barley roots: role of the dual mechanisms of alkali cation transport. *Plant Physiol* **42**: 314-318.
- Rea P.A., Britten C.J., Jennings I.R., Calvert C.M., Skiera L.A., Leigh R.A., Sanders D.** (1993) Regulation of Vacuolar H-Pyrophosphatase by Free Calcium : A Reaction Kinetic Analysis. *Plant Physiol.* **100**: 1706-1715.

- Ren Z.H., Gao J.P., Li L.G., Cai X.L., Huang W., Chao D.Y., Zhu M.Z., Wang Z.Y., Luan S., Lin H.X.** (2005) A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genet.* **37**: 1141-1146.
- Rentsch D., Laloi M., Rouhara I., Schmelzer E., Delrot S. y Frommer W.B.V.** (1995) NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **370**: 264-268.
- Rodríguez Navarro A.** (2000). Potassium transport en fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**: 1-30.
- Rodriguez-Navarro A. y Ramos J.** (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **159**: 940-945.
- Romeis T., Ludwig A.A., Martin R., Jones J.D.** (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* **20**: 5556-5567.
- Roxas V.P., Lodhi S.A., Garrett D.K., Mahan J.R. y Allen R.D.** (2000) Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **41**: 1229-1234.
- Roxas V.P., Smith R.K., Allen E.R. y Allen R.D.** (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* **15**: 988-991.
- Rubio F., Gassmann W. y Schroeder J.I.** (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science.* **270**: 1660-1663.
- Rubio L., Rosado A., Linares-Rueda A., Borsani O., Garcia-Sanchez M.J., Valpuesta V., Fernandez J.A. y Botella M.A.** (2004) Regulation of K⁺ transport in tomato roots by the TSS1 locus. Implications in salt tolerance. *Plant Physiol.* **134**: 452-459.
- Rus A., Lee B.H., Muñoz-Mayor A., Sharkhuu A., Miura K., Zhu J.-K., Bressan R.A. y Hasegawa P.M.** (2004) AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in *Planta*. *Plant Physiol.* **136**: 2500-2511.
- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B.H., Matsumoto T.K., Koiwa H., Zhu J.-K., Bressan R.A. y Hasegawa P.M.** (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 14150-14155.
- Saier M.H. Jr.** (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **64**: 354-411.
- Sakamoto A., Valverde R., Alia, Chen T.H., Murata N.** (2000) Transformation of *Arabidopsis* with the codA gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. *Plant J.* **22**: 449-453.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Cold Spring Harbor, NY).
- Samuel M.A., Miles G.P., Ellis B.E.** (2000) Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant J.* **22**: 367-376.

- Sanchez-Aguayo I., Rodriguez-Galan J.M., Garcia R., Torreblanca J., Pardo J.M.** (2004) Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta* **220**: 278-285.
- Sanchez-Barrena M.J., Martinez-Ripoll M., Zhu J.-K., Albert A.** (2005) The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *J. Mol. Biol.* **345**:1253-1264.
- Sanders D., Brownlee C., Harper J.F.** (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell*. **11**: 691-706.
- Schachtman D.P., Kumar R., Schroeder J.I., Marsh E.L.** (1997) Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 11079-11084.
- Seki M., Satou M., Sakurai T., Akiyama K., Iida K., Ishida J., Nakajima M., Enju A., Narusaka M., Fujita M., Oono Y., Kamei A., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2004) RIKEN *Arabidopsis* full-length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* **55**: 213-223.
- Serrano R.** (1988) H⁺-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods Enzymol.* **157**: 533-544.
- Serrano R., Mulet J.M., Rios G., Marquez J.A., Larrinoa I.F., Leube M.P., Mendizabal I., Pascual-Ahuir A., Proft M., Ros R., Montesino C.** (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Botany* **50**: 1023-1036.
- Shabala L., Cuin T.A., Newman I.A., Shabala S.** (2005) Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis sos* mutants. *Planta* **222**: 1041-1050.
- Shainberg I. y Letey J.** (1984) Response of soils to sodic and saline conditions. *Hilgardia* **61**: 1-57.
- Shaul O., Hilgemann D.W., de-Almeida-Engler J., Van Montagu M., Inz D., Galili G.** (1999) Cloning and characterization of a novel Mg⁺⁺/H⁺ exchanger. *EMBO J.* **18**: 3973-3980.
- Shen B., Hohmann S., Jensen R.G., Bohnert H.** (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol.* **121**: 45-52.
- Shi J., Kim K.N., Ritz O., Albrecht V., Gupta R., Harter K., Luan S., Kudla J.** (1999) Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2393-2405.
- Shi H., Lee B.H., Wu S.J. y Zhu J.-K.** (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 81-85.
- Shi H., Quintero F.J., Pardo J.M., Zhu J.-K.** (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* **14**: 465-477.
- Shi H. y Zhu J.-K.** (2002) Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* **50**: 543-550.

- Shi H., Ishitani M., Kim C., Zhu J.-K.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 6896-6901.
- Shigaki T., Cheng N.H., Pittman J.K., Hirschi K.** (2001) Structural determinants of Ca⁺⁺ transport in the *Arabidopsis* H⁺/Ca⁺⁺ antiporter CAX1. *J. Biol. Chem.* **276**: 43152-9.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. y Seki M.** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 410-417.
- Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K.** (1997) Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol.* **115**: 327-334.
- Singh I.** (2002) Peroxisomal fatty acid oxidation and cellular redox. *Methods Enzymol.* **352**: 361-372.
- Skriver K. y Mundy J.** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* **2**: 503-512.
- Stedle E. y Peterson C.A.** (1998) How does water get through roots?. *J. Exp. Bot.* **49**: 775-788.
- Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F.** (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 1035-40.
- Strathern J.N., Higgins D.R.** (1991). Recovery of plasmids from yeast into *Escherichia coli*: shuttle vectors. *Methods Enzymol.* **194**: 319-329.
- Studier F. W., y Moffatt B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Su H., Gollmack D., Zhao C., Bohnert H.J.** (2002) The expression of HAK-type K⁺ transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiol* **129**: 1482-1493.
- Su H., Gollmack D., Katsuhara M., Zhao C., Bohnert H.J.** (2001) Expression and stress-dependent induction of potassium channel transcripts in the common ice plant. *Plant Physiol.* **125**: 604-614.
- Sugden C., Crawford R.M., Halford N.G., Hardie D.G.** (1999) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.* **19**: 433-439.
- Sunarpi, Horie T., Motoda J., Kubo M., Yang H., Yoda K., Horie R., Chan W.Y., Leung H.Y., Hattori K., Konomi M., Osumi M., Yamagami M., Schroeder J.I., 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., Palmgren M.G.** (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* **11**: 677-690.
- Talke I.N., Blaudez D., Maathuis F.J., Sanders D.** (2003) CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci.* **8**: 286-293.

- Tanaka Y., Hibino T., Hayashi Y., Tanaka A., Kishitani S., Takabe T., Yokota S. y Takabe T.** (1999) Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Sci.* **148**: 131-138.
- Tester M. y Davenport R.** (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot. (Lond.)* **91**: 503-527.
- Thomashow M.F.** (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 571-599.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.** (1997) The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acid Res.* **24**: 4876-4882.
- Torok Z., Goloubinoff P., Horvath I., Tsvetkova N.M., Glatz A., Balogh G., Varvasovszki V., Los D.A., Vierling E., Crowe J.H., Vigh L.** (2001) Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 3098-3103.
- Tyerman S.D. y Skerrett M.** (1999) Root ion channels and salinity. *Scientia Horticulturae* **78**: 175-235.
- Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., 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.* **97**: 11632-11637.
- Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2000) Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* **5**: 67-74.
- Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T., Shinozaki K.** (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**: 1743-1754.
- Venema K., Belver A., Marín-Manzano M.C., Rodríguez-Rosales M.P. y Donaire J.P.** (2003) A novel intracellular K⁺/H⁺ antiporter related to Na⁺/H⁺ antiporters is important for K⁺ ion homeostasis in plants. *J. Biol. Chem.* **278**: 22453-22459.
- Venema K., Quintero F.J., Pardo J.M. y Donaire J.P.** (2002) The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.* **277**: 2413-2418.
- Vierling E.** (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 579-620.
- Vinocur B., Altman A.** (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 123-132.
- Waters E.R., Garrett J.L., y Vierling E.** (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**: 325-338.
- Webb M.R.** (1992) A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 4884-4887.

- Wieland J., Nitsche M., Strayle J., Steiner H., Rudolph H.K.** (1995). The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* **14**: 3870-3882.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inze D., Van Camp W.** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J.* **16**: 4806-4816.
- Wu C.A., Yang G.D., Meng Q.W., Zheng C.C.** (2004) The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol.* **45**: 600-607.
- Wu S.J., Ding L. y Zhu J.-K.** (1996) *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* **8**: 617-627.
- Wyn Jones R.G., Pollard A.** (1983). Proteins, enzymes and inorganic ions. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series.* Eds Laüchli A. y Pirson A. Springer-Verlag, Berlin pp. 528-562.
- Xiong L., Schumaker K.S. y Zhu J.-K.** (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**: S165-183.
- Xiong L., Zhu J.-K.** (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* **25**: 131-139.
- Xiong L., Gong Z., Rock C.D., Subramanian S., Guo Y., Xu W., Galbraith D. y Zhu J.-K.** (2001) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. *Dev Cell.* **1**: 771-781.
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T., Wu R.** (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* **110**: 249-257.
- Xu J., Li H.D., Chen L.Q., Wang Y., Liu L.L., He L., Wu W.H.** (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* **125**: 1347-1360.
- Xue Z.Y., Zhi D.Y., Xue G.P., Zhang H., Zhao Y.X., Xia G.M.** (2004) Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and reduced level of leaf Na⁺. *Plant Science* **167**: 849-859.
- Yadav R., Flowers T.J. y Yeo A.R.** (1996) The involvement of the transpirational bypass flow in sodium uptake by high- and low-sodium-transporting lines of rice developed through intravarietal selection. *Plant. Cell Environ.* **22**: 329-336.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* **10**: 88-94.
- Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K.** (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**: 251-264.

- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N.** (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Yang T., Poovaiah B.W.** (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.* **8**: 505-512.
- Yeo A.R., Flowers S.A., Rao G., Welfare K., Senanayake N. y Flowers T.J.** (1999) Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow. *Plant Cell Environ.* **22**: 559-565.
- Yeo A.R., Lee K.S., Izard P., Boursier P.J., Flowers T.J.** (1991) Short and long term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.) *J. Exp. Bot.* **42**: 881-889.
- Yeo A.R., Yeo M.E., Flowers T.J.** (1987) The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J. Exp. Bot.* **38**: 1141-1153.
- Yeo A.R. y Flowers T.J.** (1986) The physiology of salinity resistance in rice. (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust J. Plant Physiol.* **13**: 161-173.
- Yokoi S., Quintero F.J., Cubero B., Ruiz M.T., Bressan R.A., Hasegawa P.M. y Pardo J.M.** (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant J.* **30**: 529-539.
- Zeevaart J.A.D. y Creelman R.A.** (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 439-473.
- Zhang H.X. y Blumwald E.** (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.* **19**: 765-768.
- Zhang H.X., Hodson J.N., Williams J.P., 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.* **98**: 12832-12836.
- Zhao Y, Aspinall D, Paleg LG.** (1992) Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycine betaine against effects of freezing. *J. Plant Physiol.* **140**: 541-543.
- Zhu J.-K.** (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 441-445.
- Zhu J.-K.** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **53**: 247-273.
- Zhu J.-K.** (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**: 66-71.
- Zhu J.-K.** (2000) Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**: 941-948.
- Zhu J.-K., Liu J., Xiong L.** (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* **10**: 1181-1191.
- Zhu J.-K., Hasegawa P.M., Bressan R.A.** (1996) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**: 253-277.

VIII. ANEXOS

Anexo I. Oligonucleótidos utilizados.

SOS1CTBamHI-f	5'CACGGGTGGAATTGTGTTCC3'
Oligo diseñado para anillar en la región del extremo terminal de <i>AtSOS1</i> anterior al sitio de restricción única <i>BamHI</i> y utilizado junto a 3'SOS1XbaI para amplificar el extremo carboxiterminal completo de <i>AtSOS1</i> .	
SOS1XhoI-f	5'CGGTTACATTGAAAACCTCGAGAA3'
Oligo diseñado para anillar en la región del extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> donde se localiza el sitio de restricción única <i>XhoI</i> (incluido).	
742BamHI-f	5'GAGGATCCTCGGTTGCTCTTCCTCCTGC3'
Oligo diseñado para anillar en la región del extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> correspondiente a la serina 742 y junto a 3'SOS1XbaI y 998XbaI-r se ha empleado para amplificar los fragmentos carboxiterminales de <i>AtSOS1</i> Δ 742-1146 y Δ 742-998 respectivamente. Añade un sitio de restricción <i>BamHI</i> .	
998BamHI-f	5'TCTATGGATCCCAGCTTCAGAGATCATT3'
Oligo diseñado para anillar en la región del extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> correspondiente a la glutamima 998 y junto a 3'SOS1XbaI se ha empleado para amplificar el extremo carboxiterminal Δ 998-1146 de <i>AtSOS1</i> . Añade un sitio de restricción <i>BamHI</i> .	
5'SOS1PLN	5'CAGGATCCCCACTAAACCCAGCTCAA3'
Oligo diseñado para anillar en la región del extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> correspondiente a la prolina 1073 y junto a 3'SOS1XbaI se ha empleado para amplificar el extremo carboxiterminal Δ 1073-1146 de <i>AtSOS1</i> . Añade un sitio de restricción <i>BamHI</i> .	
998XbaI-r	5'GGTCTAGACTAATCAGAGCTTGAGCTACG3'
Oligo diseñado para anillar en extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> , incluyendo el codon de parada. Añade un sitio de restricción <i>XbaI</i> .	
3'SOS1XbaI	5'GCTCTAGATCATAGATCGTTCCTGAAAA3'
Oligo diseñado para anillar en extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> , incluyendo el codon de parada. Añade un sitio de restricción <i>XbaI</i> .	
SOS1A1KpnI-r	5'CGGGGTACCTCATAGATCGTTCCTGAAAACGATTTACTCGGgagcTCGATTCTCACAACGATT3'
Oligo diseñado para anillar en extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> , incluyendo el codon de parada y aplicando la mutación puntual S1136A. Añade un sitio <i>KpnI</i> .	
SOS1A2KpnI-r	5'CGGGGTACCTCATAGATCGTTCCTGAAAACGATTTcgCGGcGAATCGATTCTCACAACGATT3'
Oligo diseñado para anillar en extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> , incluyendo el codon de parada y aplicando la mutación puntual S1138A. Añade un sitio <i>KpnI</i> .	
SOS1A1-2KpnI-r	5'CGGGGTACCTCATAGATCGTTCCTGAAAACGATTTcgCGGcgCGTCGATTCTCACAACGATT3'
Oligo diseñado para anillar en extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> , incluyendo el codon de parada y aplicando las mutaciones puntuales S1136A y S1138A. Añade un sitio <i>KpnI</i> .	
SOS1D1-2KpnI-r	5'CGGGGTACCTCATAGATCGTTCCTGAAAACGATTTatcCGGatcATCGATTCTCACAACGATT3'
Oligo diseñado para anillar en extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> , incluyendo el codon de parada y aplicando las mutaciones puntuales S1136D y S1138D. Añade un sitio <i>KpnI</i> .	
SOS1CTSacI-r	5'ATGGGAGCTCTCATAGATCGTTCCTGAA3'
Oligo diseñado para anillar en extremo carboxiterminal de <i>AtSOS1</i> , incluyendo el codon de parada. Añade un sitio de restricción <i>SacI</i> .	

RSOS1A	5'GCGTCGACAATCCATGGACAATCCCGAGGCGG3'
Oligo diseñado para anillar en el extremo aminoterminal de <i>OsSOS1</i> incluyendo el codon de inicio.	
RSOS1B	5'TGTGATAAAAATTGGATCCAATGAATGCC3'
Oligo diseñado para anillar en la región de <i>OsSOS1</i> donde se localiza el sitio de restricción única <i>BamHI</i> . Junto a RSOS1A se han utilizado para amplificar el fragmento de la región codificante de <i>OsSOS1</i> (desde el nucleótido +1 al +2432) libre de intrones.	
OsBglII_f	5'AAATGGCAACACATGAGCTCAGGG3'
Oligo diseñado para anillar en la región del extremo carboxiterminal de <i>OsSOS1</i> donde se localiza el sitio de restricción única <i>BglIII</i> (incluido).	
OsSOS1His6X-r	5'TGAGCGGCCGCTCAGTGATGGTGTGATGGTGTGATGTCGATCAGCAGCGCT3'
Oligo diseñado para anillar en extremo carboxiterminal de <i>OsSOS1</i> , desplazando el codon de parada para aplicar una cola de seis histidinas. Añade un sitio <i>NotI</i> .	
OsCBL4-f	5'TCGCCATGGGATGCGCGTCGT3'
OsCBL4-r	5'TATTTTCAGTCATGGGCTTCT3'
Oligos diseñados para amplificar la secuencia codificante completa de <i>OsCBL4</i> (Entrada AK101368).	
OsK24-f	5'GGCGGATGGGAGGGGAGGAGG3'
OsK24-r	5'CCAGGCTAGCAT GTGGCTGTC3'
Oligos diseñados para amplificar la secuencia codificante completa de <i>OsCIPK24</i> (Entrada AK102270).	
OsK24Δ315-r	5'CACCTAAAGAGGGCCACCATC3'
Oligo diseñado para anillar en la región del extremo carboxiterminal de <i>OsCIPK24</i> que precede a la leucina 315 (relativa al inicio de la transcripción en la metionina +1), aplicando posteriormente un codón de parada para producir el alelo mutante <i>OsCIPKΔ315(309)</i> .	
OsM2-f	5'CGCGGATCCGCGGATGGCGGGCGGGAGGA3'
Oligo diseñado para anillar en el extremo aminoterminal de <i>OsCIPK24</i> , desplazando el inicio de la transcripción a la metionina en la posición +7.	
OsStuI-r	5'TCCACAAG TTGTGTGAAG3'
Oligo diseñado para anillar en la región aminoterminal de <i>OsCIPK24</i> donde se localiza el sitio de restricción única <i>StuI</i> (incluido).	
NPTII-f	5'GCGTTGGGTGGAGAGGCTAT3'
NPTII-r	5'TAAAGCACGAGGAAGCGGTC3'
Oligos diseñados para amplificar un fragmento de ~700 pb del gen <i>NPTII</i> , responsable de la resistencia a kanamicina.	
TUB4_f	5'GTCCAGTGTCTGTGATATTGCACC3'
TUB4_r	5'GCTTACGAATCCGAGGGTGCC3'
Oligos diseñados para amplificar un fragmento de ~300 pb del gen de la <i>TUB4</i> de <i>Arabidopsis</i> en los ensayos de integridad de las muestras de ADN genómico.	
sos 1-1-f	5'ATTGCATCAGTTATTTGGCTCAAGT3'
sos 1-1-r	5'TACAAAGAGAATATCTTAGCACAGG3'
Oligos utilizados para la confirmación de mutantes <i>sos1-1</i> de <i>Arabidopsis</i> , tal y como se describe en el apartado III.6.B.1.	
sos 2-2-f	5'CTTTTCGTTATATTG3'
sos 2-2A-r	5'CAATTCCATCAAAC3'
sos 2-2B-r	5'CAATTCCATCAAAA3'
Oligos utilizados para la confirmación de mutantes <i>sos2-2</i> de <i>Arabidopsis</i> , tal y como se describe en el apartado III.6.B.2.	

sos 3-1-r	5'GTCTTCCATTCATCTATATCG3'
sos 3-1A-f	5'GTTGCTTCAAGTTACGACAAA3'
sos 3-1B-f	5'GTTGCTTCAAGTTGTACGATT3'
Oligos utilizados para la confirmación de mutantes <i>sos3-1</i> de <i>Arabidopsis</i> , tal y como se describe en el apartado III.6.B.3.	
NOST-r	5'CATCGCAAGACCGGCAACAGGATT3'
Oligo diseñado para anillar en el terminador <i>NOS</i> y utilizado para secuenciar y/o amplificar insertos desde el casete de expresión CaMV35S _{PRO} -NOS _{TER} del vector binario pBI321.	
CaMV35S-r	5'CGGATTCCATTGCCAGCTATCTG3'
Oligo diseñado para anillar en el promotor <i>CaMV35S</i> y utilizado para secuenciar y/o amplificar insertos desde el casete de expresión CaMV35S _{PRO} -NOS _{TER} del vector binario pBI321.	

Anexo II. Abreviaturas.

A	Absorbancia
A/B	Acrilamida/Bisacrilamida
ABA	Ácido Abcísico
Amp	Ampicilina
AP	Medio Arginina-Fosfato para el cultivo de levaduras
APS	Persulfato amónico
ATP	Adenosina trifosfato
Bq	Bequerelio
BSA	Albúmina de suero sanguíneo
BTP	Tampón Bis Tris-Propano
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Ci	Curio
CIP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternero
Col 0	Arabidopsis thaliana cv Columbia silvestre
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DEPC	Dietil pirocarbonato
DIC	Disociación inducida por colisión
DNA (ADN)	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleósidos trifosfato (dATP+dCTP+dGTP+dTTP)
DO	Densidad optica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino tetracético
EEA	Espectrometría de Emisión Atómica
EMS	Etilmetano sulfonato
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , OH^-)
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
F	Fluorescencia
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
g	gramo(s)
gl1	Arabidopsis thaliana mutante glabrous1
GST	Glutation-S-transferasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
IPTG	Isopropil-b-D-tiogalactopiranósido
Kam	Kanamicina
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro(s)
LB	Medio Luria-Bertani para el cultivo de bacterias
LBK	Medio Luria-Bertani Potásico
M	Molar
m/z	Relación masa/carga
MES	Ácido 2-(N morfolino) etanosulfónico

OPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MS	Medio Murashide-Skoog para el cultivo de plantas
MS-MS	Espectrometría de Masas en Tandem
mV	milivoltios
oligoT	oligonucleótido de politiminas
ORF	Marco abierto de lectura
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
PTM	Modificaciones post-traduccionales
QLT	<i>Quantitative trait loci</i>
RNA (ARN)	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR de transcripción reversa
SDS	N-dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis con SDS-Poliacrilamida
SSC	Tampón citrato sódico salino
T1	Primera generación transgénica
T2	Segunda generación transgénica
TAE	Tampón Tris-Acético-EDTA para electroforesis de ADN
TBE	Tampón Tris-Bórico-EDTA para electroforesis de ADN
T-DNA	DNA de transferencia
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
Tet	Tetraciclina
Tm	Temperatura media de anillamiento del oligonucleótido
Tris	Tampón Tris-(hidroximetil)-aminoetano
U	Unidad de actividad enzimática
YNB	Medio <i>Yeast-Nitrogen-Base</i> para el cultivo de levaduras

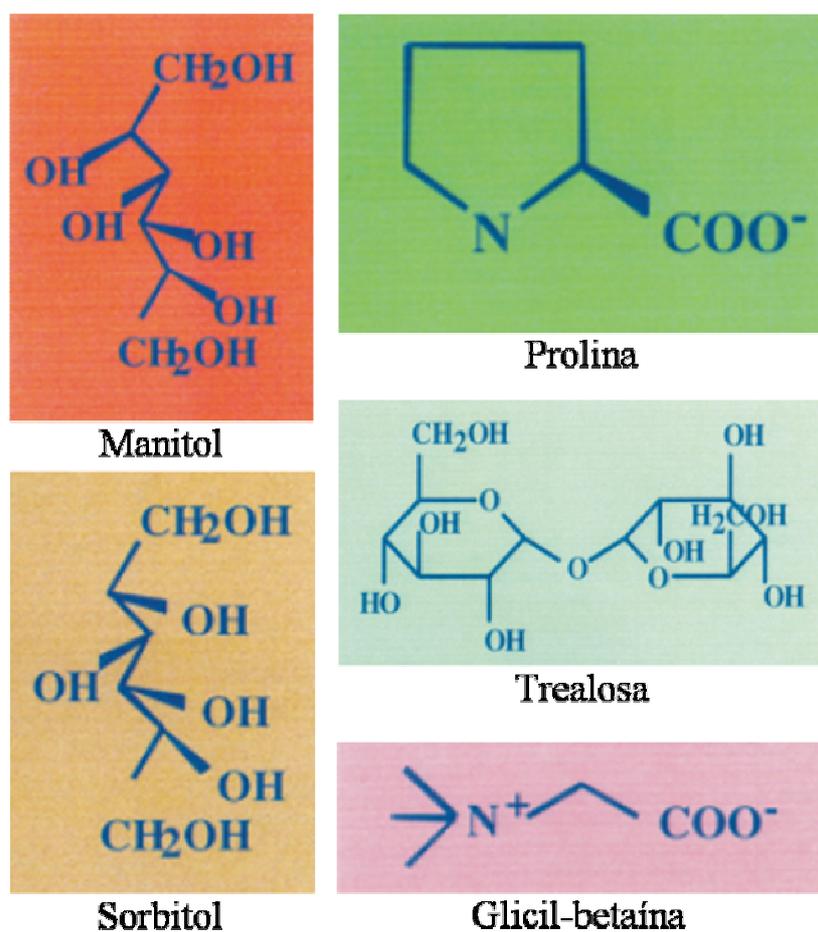


Figura 1. Principales osmolitos responsables del mantenimiento del equilibrio osmótico y de la protección de estructuras. En todos los casos la actividad osmoprotectora ha sido asociada a la acumulación de estos metabolitos en sistemas naturales o en plantas transgénicas.

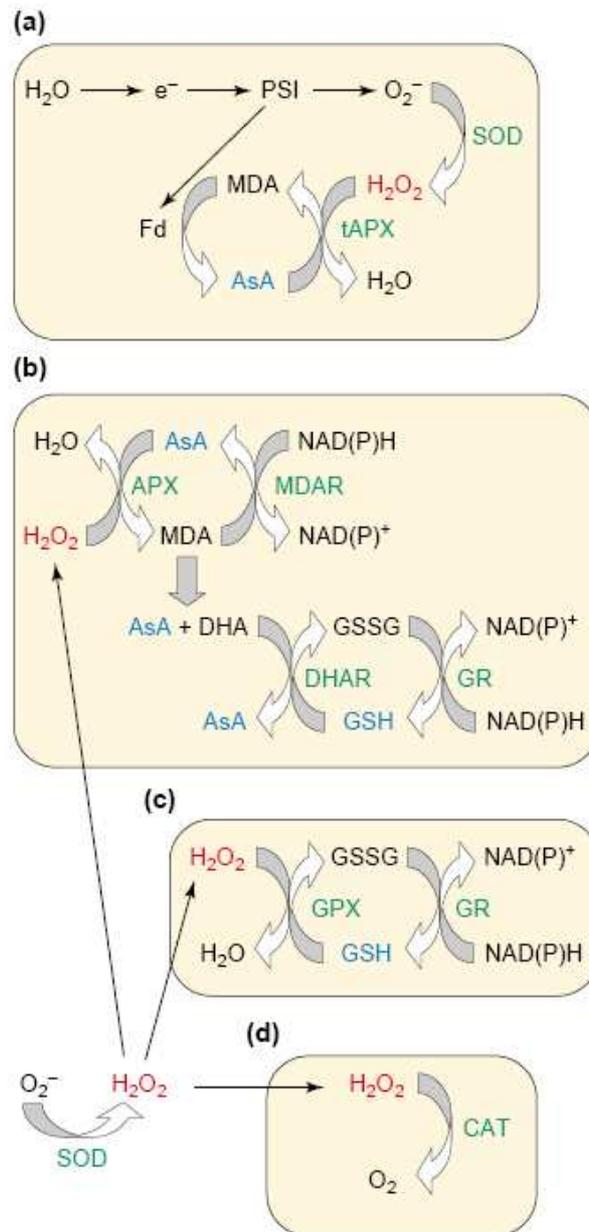


Figura 2. Principales sistemas detoxificadores de ROS en plantas. (a) Ciclo agua-agua. (b) Ciclo ascorbato-glutation. (c) Ciclo de la glutatión peroxidasa (GPX). (d) Ciclo de la catalasa (CAT). La superóxido dismutasa (SOD) actúa en la primera línea de defensa catalizando la dismutación del ión superóxido (a). La ascorbato peroxidasa (APX), GPX y CAT actúan a continuación detoxificando la molécula de H_2O_2 producida. En contraste con la CAT (d), la APX y la GPX requieren la actividad del ciclo ascorbato-glutation para regenerar el ácido ascórbico (AsA) o el glutatión reducido (GSH) respectivamente. Este ciclo emplea electrones directamente desde el aparato fotosintético (a) o $NAD(P)H^+$ (b, c) como poder reductor. Las ROS se destacan en rojo, los antioxidantes en azul y los sistemas detoxificadores en verde. Abreviaturas: DHA, dehidroascorbato; DHAR dehidroascorbato reductasa; Fd, ferredoxina; GR, glutatión reductasa; GSSG, glutatión oxidado; MDA, monodehidroascorbato; MDAR, monodehidroascorbato reductasa; PSI, fotosistema I; tAPX, ascorbato peroxidasa ligada al tilacoide. (Mittler, 2002).

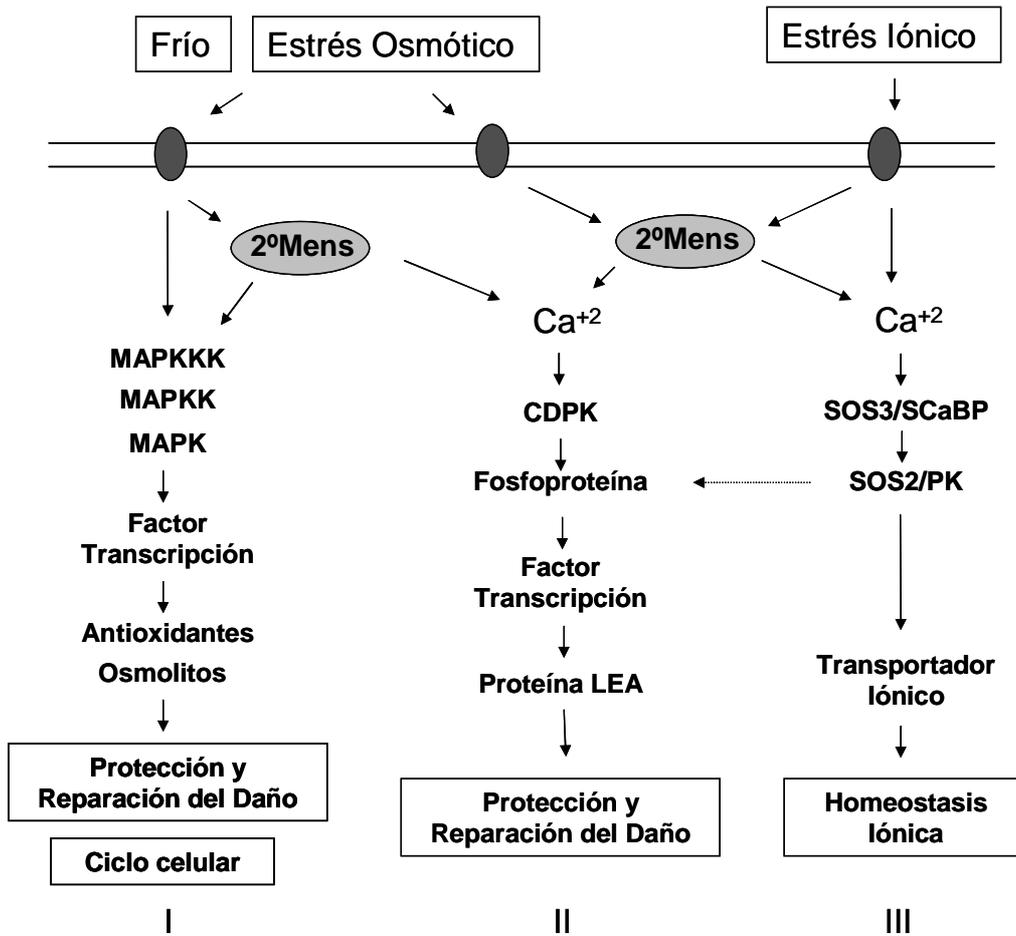


Figura 3. Principales rutas de señalización en plantas durante el estrés abiótico. (I) Ruta de señalización osmótico/oxidativa. **(II)** Ruta de activación de los genes de tipo LEA. **(I)** Ruta de señalización SOS. (Adaptado de Xiong *et al.*, 2002).

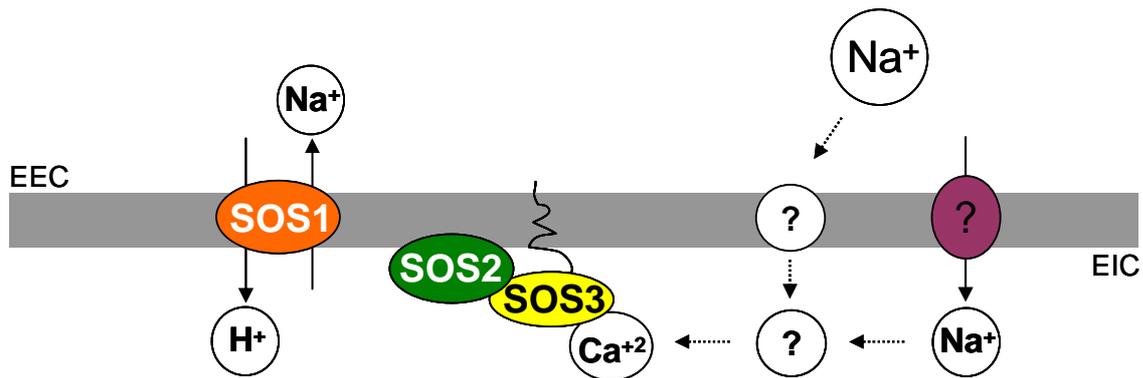


Figura 4. Modelo de regulación del sistema SOS de halotolerancia en la célula vegetal. Se desconoce si el exceso de Na^+ es detectado extracelularmente o en el citosol y sus sensores aún no han sido identificados. No obstante se ha demostrado que estrés por Na^+ induce un aumento de los niveles citosólicos de Ca^{++} . El Na^+ penetra al interior celular a través de transportadores que podrían implicar a los canales no selectivos de cationes y/o a los transportadores de tipo HKT. SOS3 es un sensor de Ca^{++} que porta un dominio de miristoilación para su direccionamiento a la membrana plasmática. La unión de SOS3 al dominio autoinhibitorio de SOS2 en respuesta a una señal de Ca^{++} , suprime la inhibición de la subunidad catalítica de SOS2 y dirige al complejo quinasa SOS2/SOS3 activado a la membrana plasmática, donde va a fosforilar al antiportador Na^+/H^+ SOS1, promoviendo así la expulsión activa del exceso de sodio citosólico. Abreviaturas: EEC: espacio extracelular; EIC: espacio intracelular.

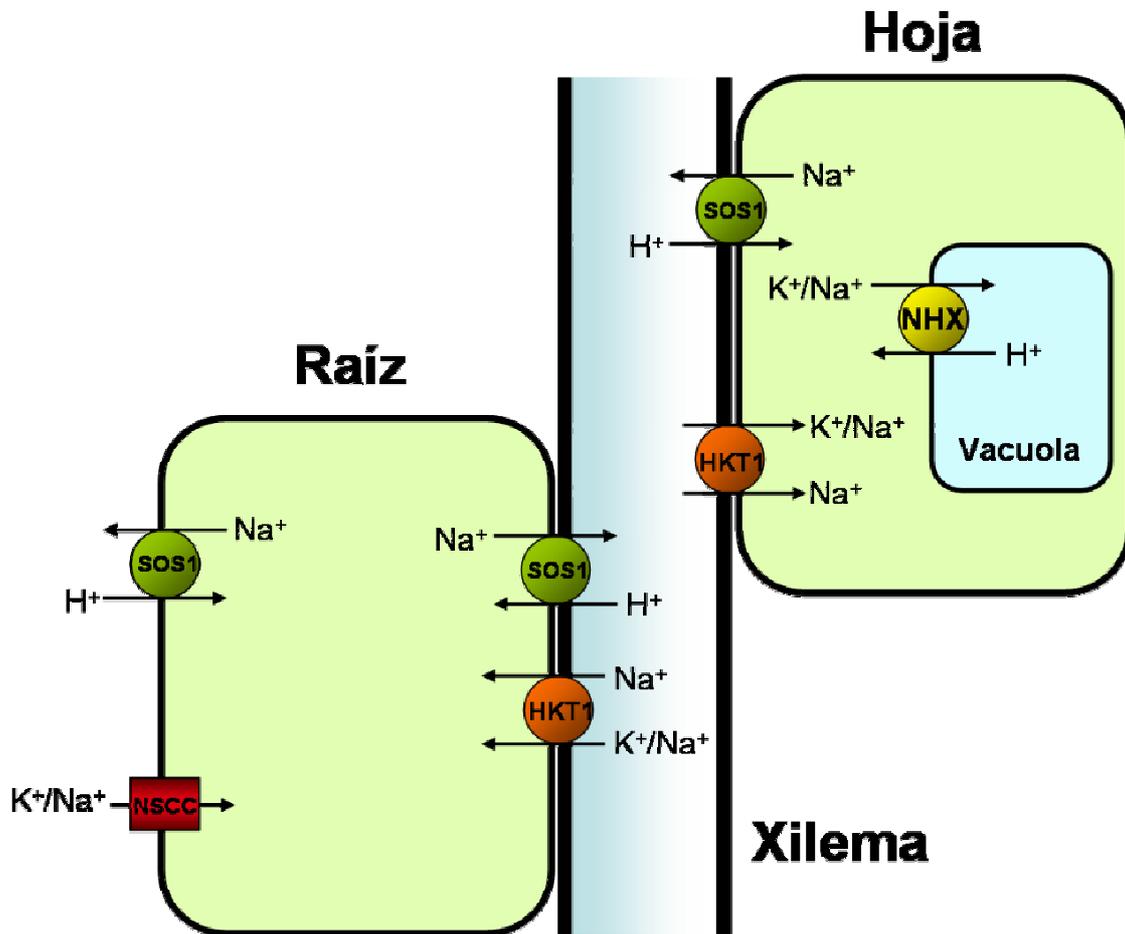


Figura 5. Modelo de distribución del Na^+ en plantas de *Arabidopsis*. La absorción del Na^+ tiene lugar inicialmente a nivel de las células epidérmicas y corticales de la raíz. Pese a que aún se desconoce la identidad exacta de los transportadores implicados en la absorción de Na^+ , datos bioquímicos y electrofisiológicos apuntan a la actividad de los canales no selectivos de cationes (NSCC). Cuando la salinidad es moderada, SOS1 funciona cargando sodio en el xilema de la raíz para su distribución controlada en la parte aérea y su almacenamiento en las células del mesófilo de la hoja. En condiciones de estrés salino severo, SOS1 actúa retrasando la velocidad neta de descarga de Na^+ del xilema foliar mediante su eflujo desde las células del parénquima, para así dar tiempo a su compartimentación vacuolar. HKT1 en cambio está implicado en la descarga selectiva de sodio desde los vasos del xilema hacia sus células parenquimáticas para su almacenamiento vacuolar y/o su recirculación floemática desde la parte aérea a la raíz, protegiendo de este modo al tejido foliar del estrés salino.

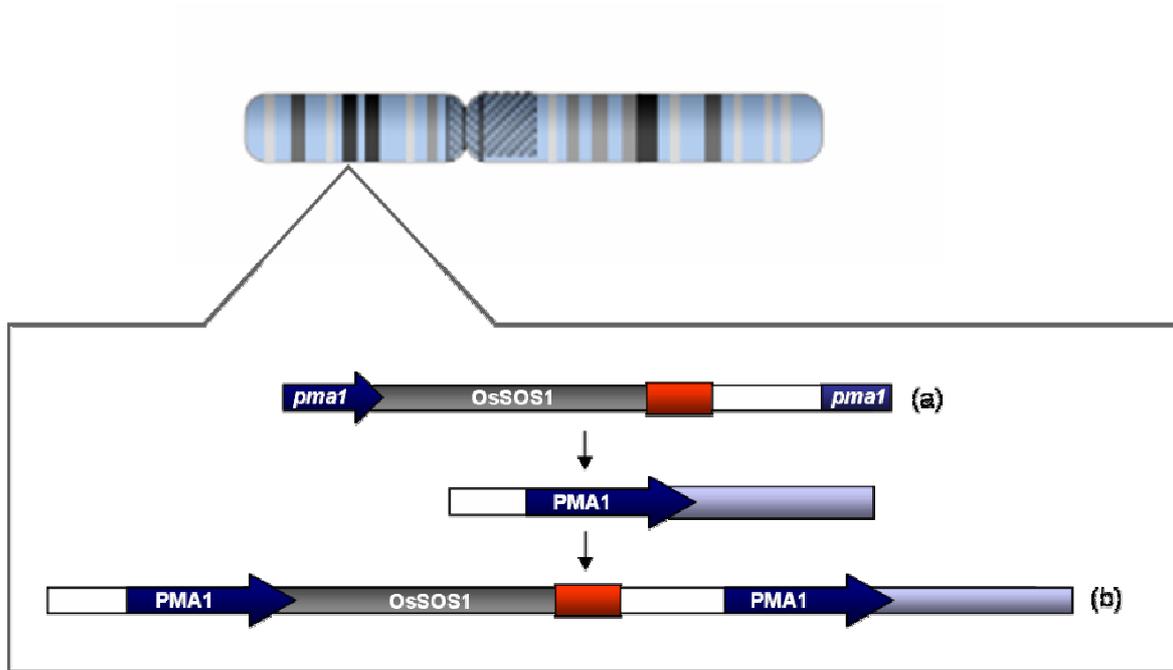


Figura 6. Representación esquemática de la inserción puntual del casete de expresión *PMA1:OsSOS1:ADHI* en el genoma de *S. cerevisiae*. El vector pDROsSOS1, libre del marcador URA3 y del origen de replicación en la levadura (2μ), es linealizado por restricción con *KpnI* para obtener un segmento de ADN flanqueado en ambos extremos por secuencias correspondientes al promotor *PMA1* (a). Dichas secuencias reconocen y se recombinan con sus homólogas en el genoma de la levadura, facilitando así la inserción puntual del vector (b).

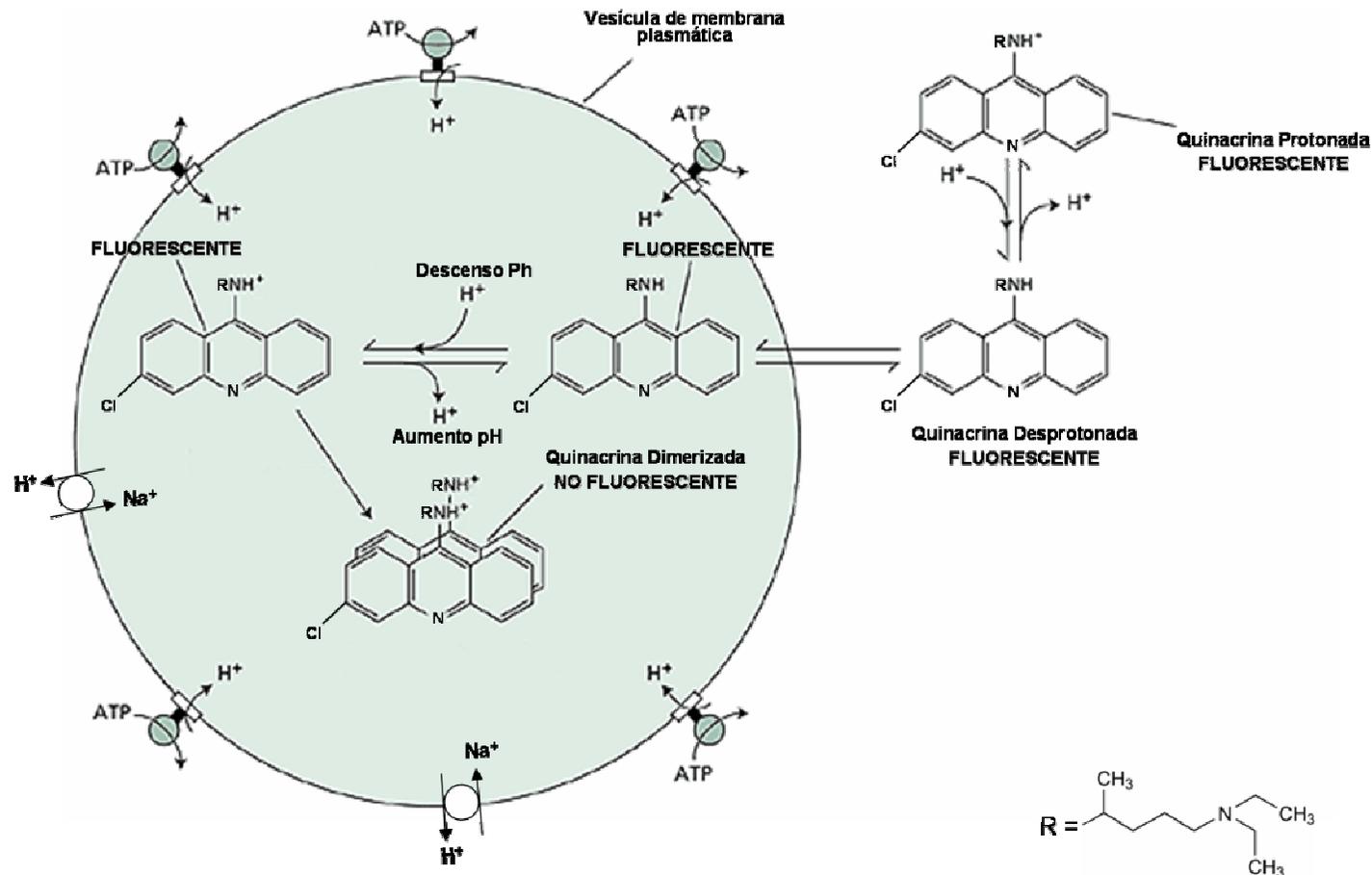


Figura 7. Detección con quinacrina de alteraciones en el pH interno de vesículas de membrana plasmática de levadura. El fluoróforo quinacrina en su forma desprotonada penetra en el interior de las vesículas por difusión pasiva. Una vez dentro el pH ácido generado por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de la levadura favorece su protonación y subsiguiente dimerización, detectándose en consecuencia un descenso en la medida de fluorescencia. Cuando en presencia del antiportador Na^+/H^+ SOS1 el medio se suplementa con sodio, la entrada del catión a favor del gradiente electroquímico provoca un descenso en el pH interno que favorece la desdimerización de la quinacrina y un consiguiente aumento en la medida de la fluorescencia.

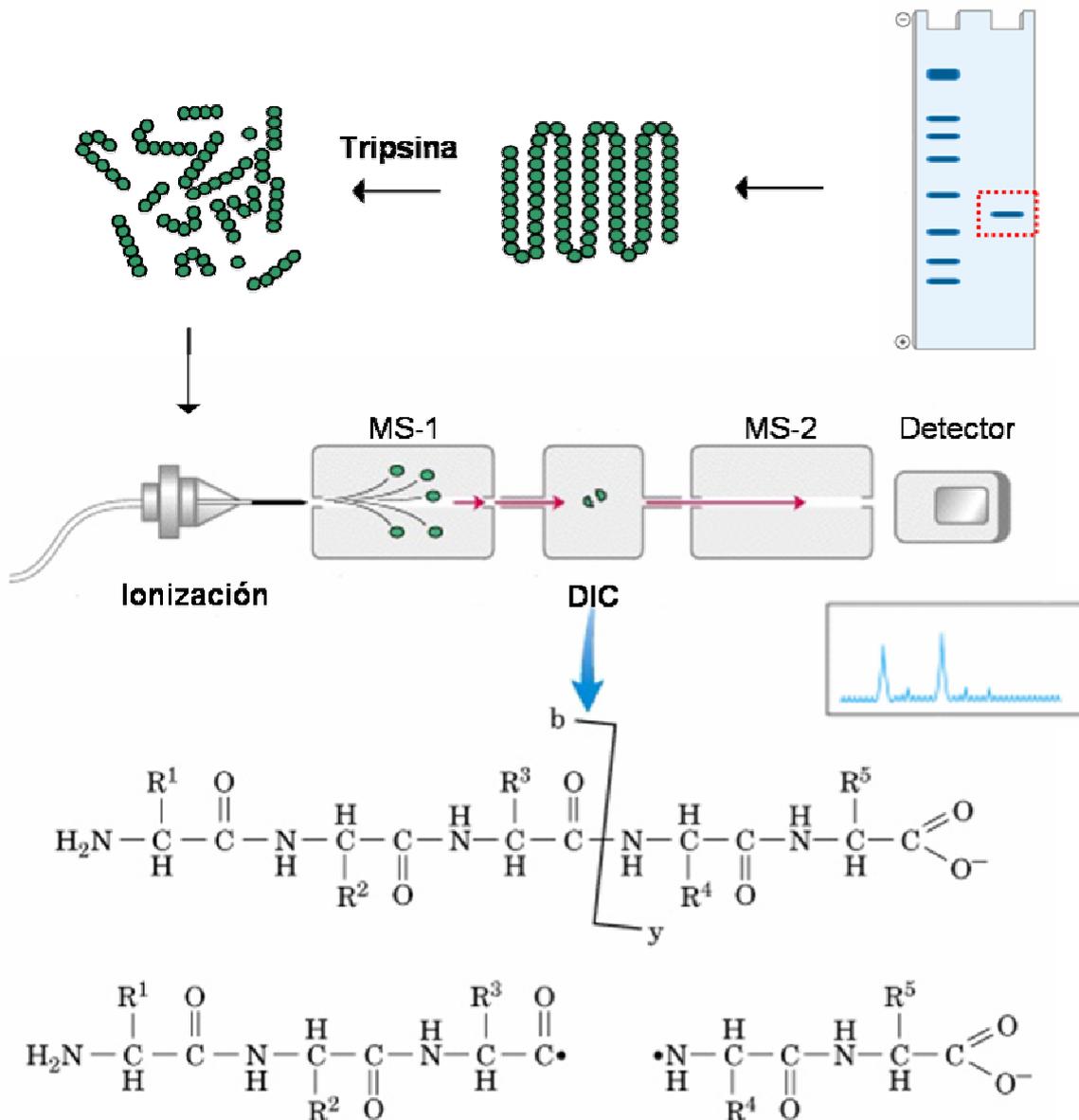


Figura 8. Espectrometría de Masas en tandem (MS-MS). La proteína de interés purificada por cromatografía SDS-PAGE se digiere con tripsina y la mezcla de péptidos resultante, previo fraccionamiento cromatográfico, se inyecta en el espectrofotómetro de masas. Tras su ionización, los péptidos se separan en función de su masa (MS-1), penetrando posteriormente en la celda de colisión, donde tiene lugar su fragmentación, a través de los enlaces peptídicos, en iones de menor tamaño (Disociación Inducida por Colisión). Estos iones son a su vez analizados en una segunda ronda de espectrometría de masas (MS-2) para finalmente generar un espectrograma conteniendo la información referente a su secuencia peptídica.

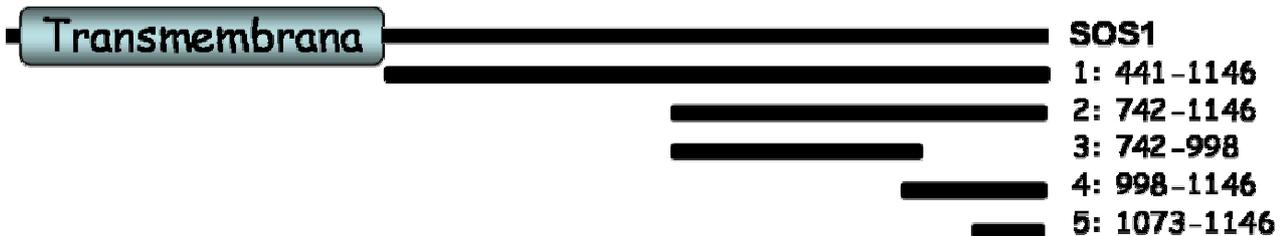
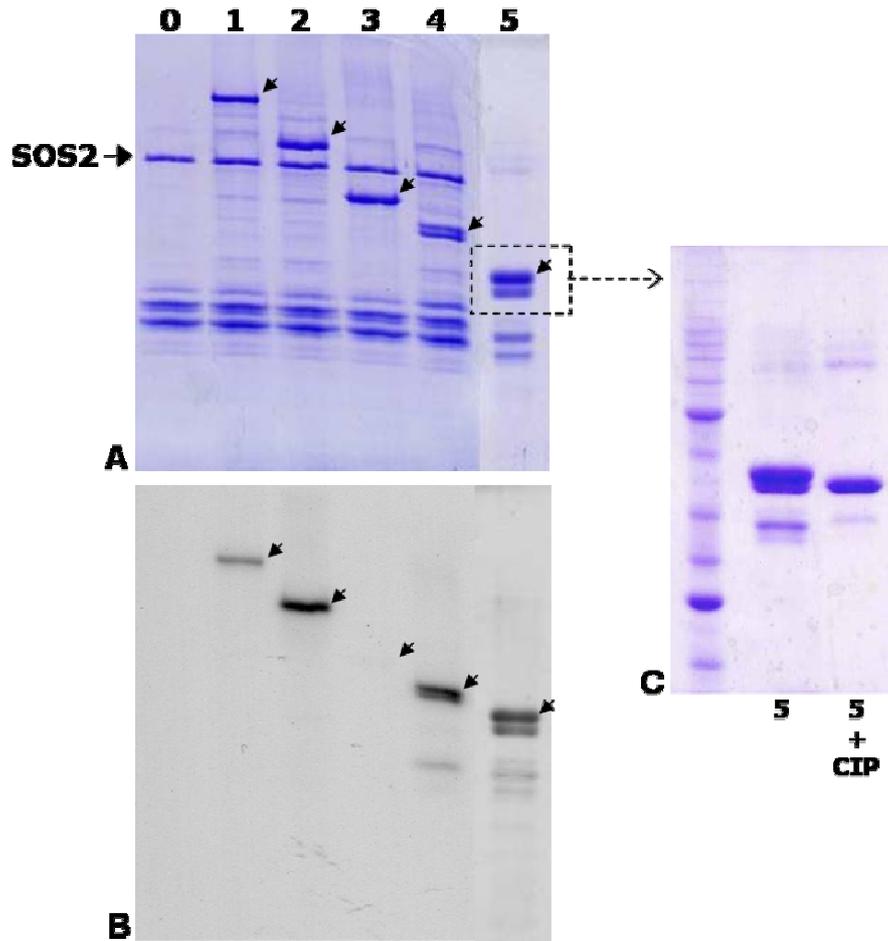


Figura 9. Acotamiento del dominio carboxiterminal de fosforilación de SOS1 por la kinasa SOS2. Fusiones translacionales a GST de los fragmentos (1) Δ 441-1146, (2) Δ 742-1146, (3) Δ 742-998, (4) 998-1146 y (5) Δ 1073-1146 del extremo carboxiterminal del antiportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis* (AtSOS1) purificadas mediante cromatografía de afinidad, se incubaron en tampón de fosforilación con 100 ng de la fusión GST:SOS2T/ Δ 308, tal y como se describe en el apartado III.8.E. Alícuotas de las reacciones de fosforilación, incluyendo un control sin sustrato (0), se resolvieron por electroforésis SDS-PAGE (A) y se autoradiografiaron (B). Las flechas indican las bandas correspondientes a las fusiones purificadas. Adicionalmente se incluyó un control con la fusión GST:SOS1CTA1073-1146 (5) en ausencia de SOS2, con objeto de analizar el efecto de la desfosforilación con CIP sobre el doblete de bandas observado (C).

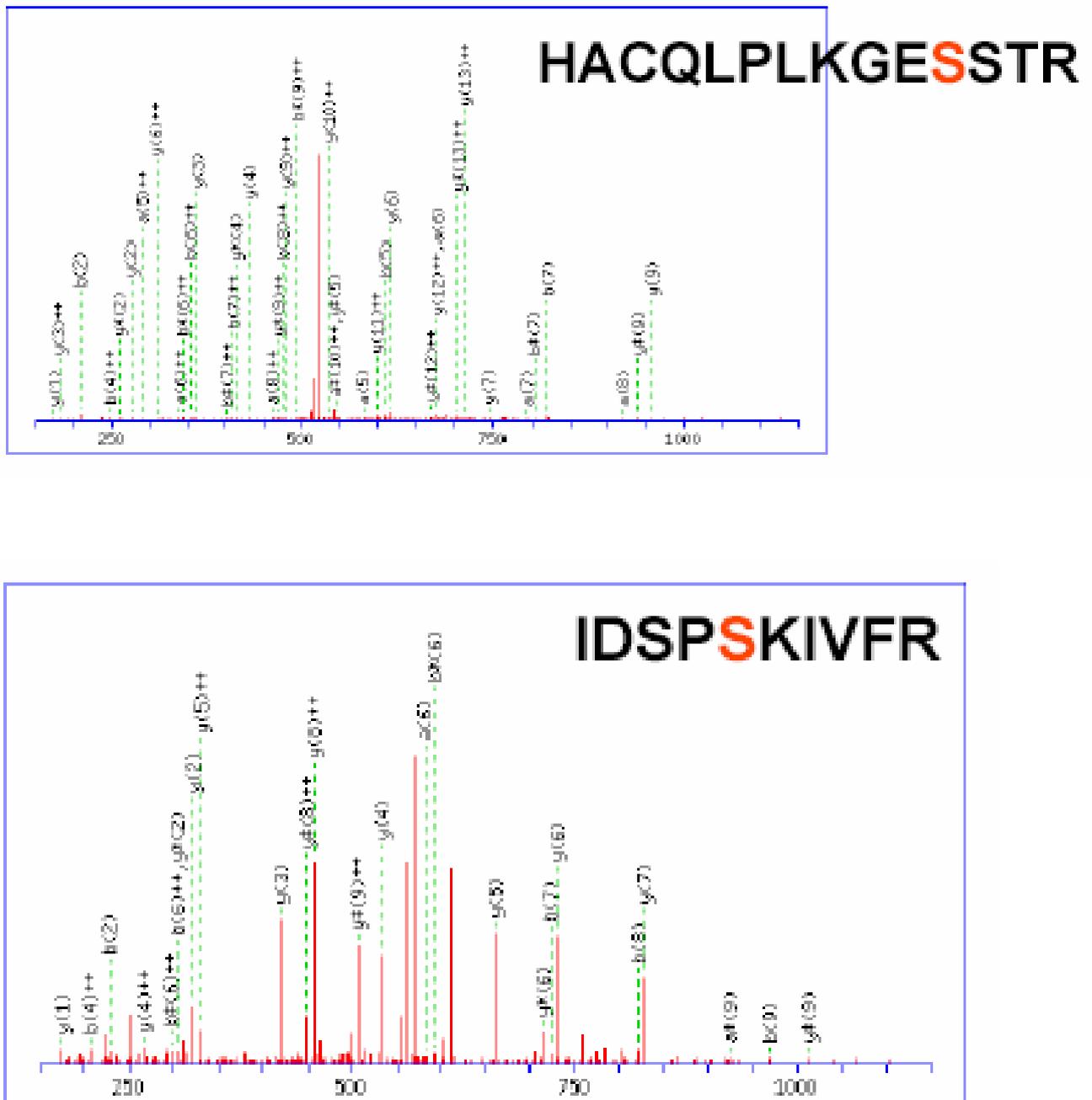


Figura 10. Fracción del espectrograma de masas correspondiente a los fosfopéptidos **IDSPSKIVFR**, y **HACQLPLKGESSTR**. El análisis espectrofotométrico de la fusión GST:SOS1CT(1073-1146) apunta a las serinas S1138 y S1110, incluidas en los péptidos IDSPSKIVFR y HACQLPLKGESSTR respectivamente, como posibles dianas de fosforilación por SOS2T/DA308.

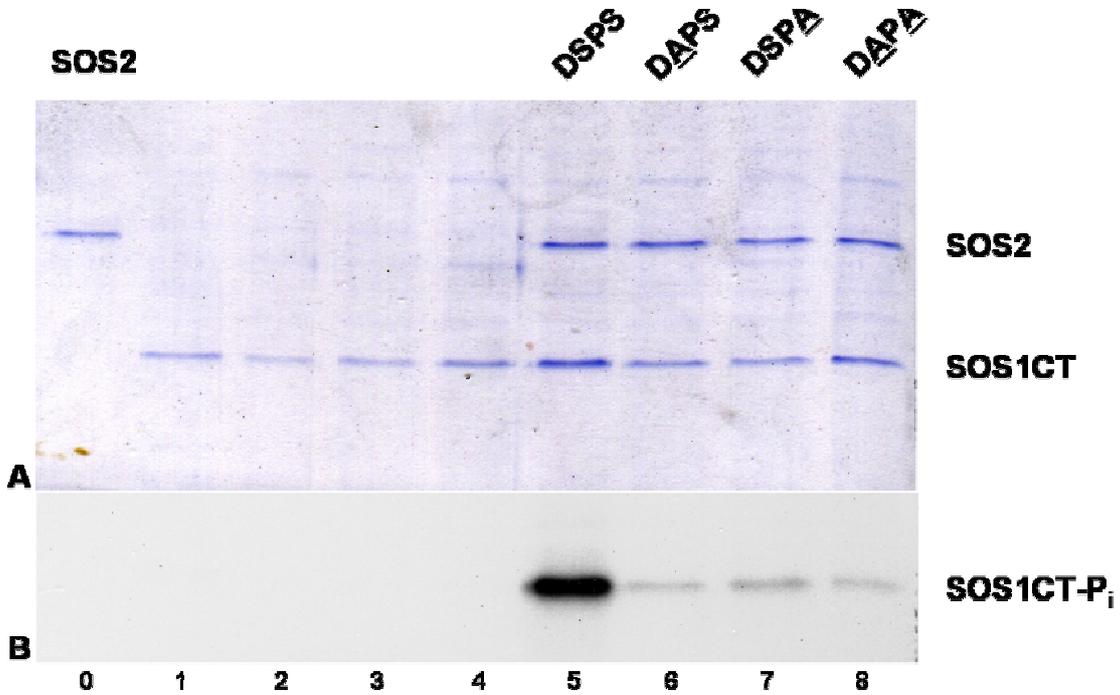


Figura 12. Fosforilación *in vitro* de los mutantes puntuales de fosforilación SOS1S1136A, SOS1S1138A y SOS1S1136A/S1138A. Fusiones traduccionales a GST del fragmento carboxiterminal $\Delta 441-1146$ del antiportador de *Arabidopsis* (AtSOS1) silvestre (DSPS) y mutantes SOS1S1136A (DAPS), SOS1S1138A (DSPA) y SOS1S1136A/S1138A (DAPA), purificadas mediante cromatografía de afinidad, se incubaron en tampón de fosforilación con 100 ng de la fusión GST:SOS2T/D $\Delta 308$, tal y como se describe en el apartado III.8.E. Alícuotas de las reacciones de fosforilación, se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE (A) y se autoradiografiaron (B). Calles: (0) SOS2T/D $\Delta 308$; (1) GST:SOSCT $\Delta 441-1146$ silvestre; (2) GST:SOSCT $\Delta 441-1146$ mutante S1136A; (3) GST:SOSCT $\Delta 441-1146$ mutante S1138A; (4) GST:SOSCT $\Delta 441-1146$ mutante S1136A/S1138A; (5) SOS2T/D $\Delta 308$ + GST:SOSCT $\Delta 441-1146$ silvestre; (6) SOS2T/D $\Delta 308$ + GST:SOSCT $\Delta 441-1146$ mutante S1136A; (7) SOS2T/D $\Delta 308$ + GST:SOSCT $\Delta 441-1146$ mutante S1138A; (8) SOS2T/D $\Delta 308$ + GST:SOSCT $\Delta 441-1146$ mutante S1136A/S1138A.

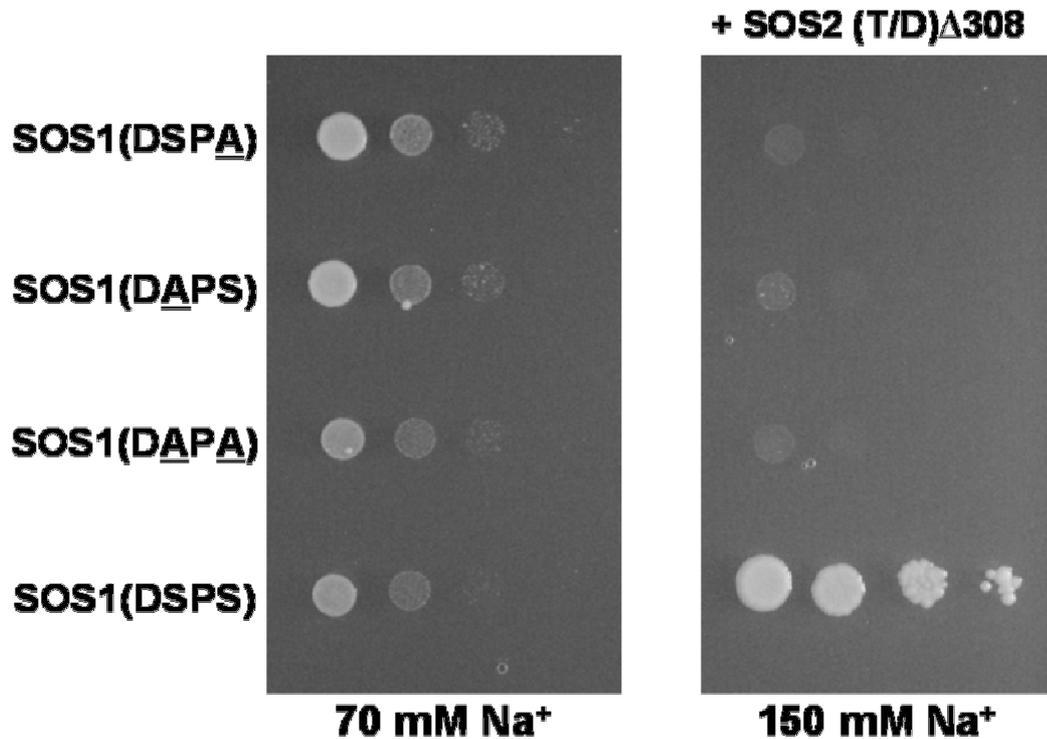


Figura 13. Caracterización funcional de los mutantes no fosforilables SOS1-S1136A, SOS1-S1138A y SOS1-S1136A/S1138A en presencia de la kinasa hiperactiva SOS2T/DΔ308. Transformantes de levadura AXT3K con el antiportador SOS1-S1136A/S1138A (DAPA), SOS1-S1138A (DSPA), SOS1-S1136A (DAPS), y SOS1 silvestre (DSPS), en presencia o ausencia de la kinasa SOS2T/DΔ308, se cultivaron en medio YNB líquido hasta saturación. Cinco microlitros de diluciones decimales seriadas se distribuyeron en placas de medio AP suplementado con 1mM de KCl y las concentraciones indicadas de NaCl, y se incubaron a 28°C durante 3 días. Los plásmidos utilizados para la expresión de las proteínas SOS son: pYPGE15, para las distintas formas del antiportador SOS1; y p414GPD, para la kinasa hiperactiva SOS2T/DΔ308.

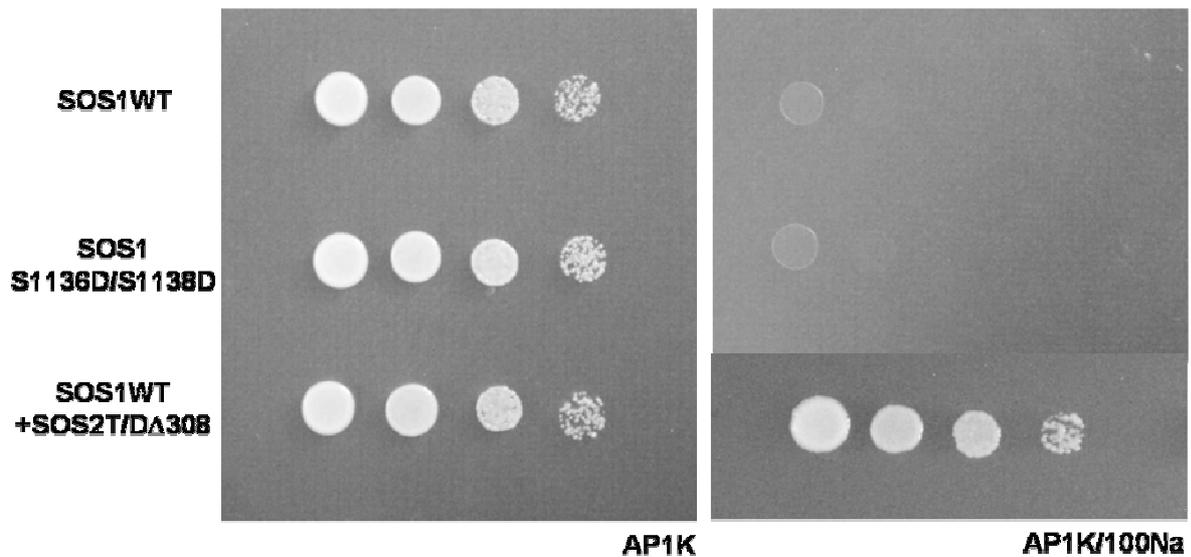


Figura 14. Caracterización funcional del mutante SOS1-S1136D/S1138D. Transformantes de levadura AXT3K expresando el antiportador mutante SOS1-S1136D /S1138D, que mimetiza el estado fosforilado, o el antiportador silvestre SOS1WT, en presencia y ausencia de la kinasa hiperactiva SOS2T/DΔ308, se cultivaron en medio YNB líquido hasta saturación. Cinco μ L de diluciones decimales seriadas se distribuyeron en placas de medio AP suplementado con 1mM de KCl y las concentraciones indicadas de NaCl y se incubaron a 28°C durante 3 días. Los plásmidos utilizados para la expresión de las proteínas SOS fueron: pYPGE15, para ambas formas del antiportador SOS1; y p414GPD, para la kinasa hiperactiva SOS2T/DΔ308.

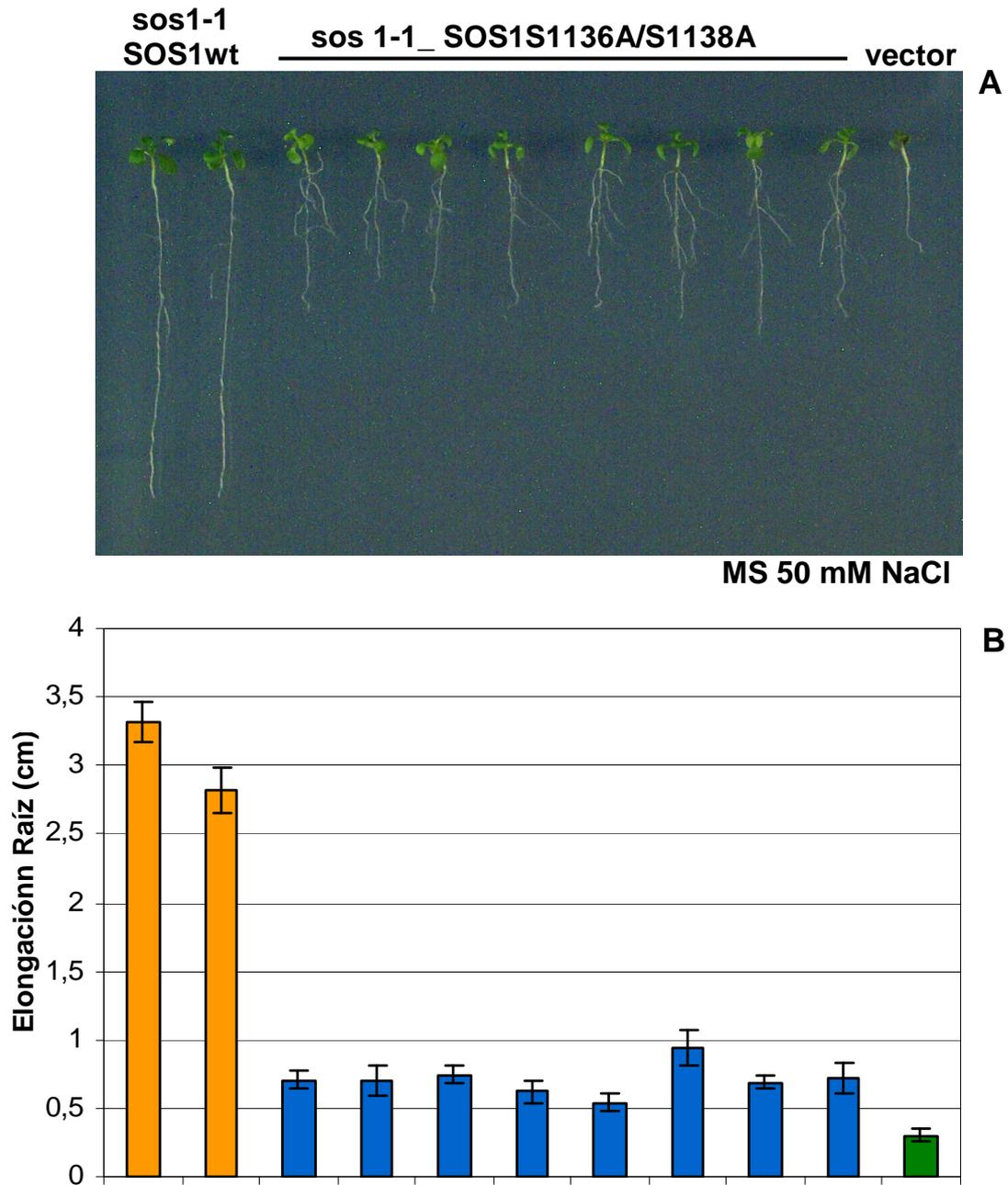


Figura 15. Complementación del mutante de *Arabidopsis sos1-1* con el mutante puntual SOS1-S1136A/S1138A. (A) Plántulas de cinco días germinadas en MS se transfirieron a placas del mismo medio suplementadas con 50 mM de NaCl y se fotografiaron transcurridos 10 días de tratamiento salino. Izquierda, dos líneas transgénicas independientes de mutantes *sos1-1* expresando AtSOS1 desde el promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor. Centro, ocho líneas transgénicas independientes de mutantes *sos1-1* expresando el antiportador mutante SOS1-S1136A/S1138A bajo el control del mismo promotor 35S. Derecha, línea transgénica mutante *sos1-1* transformada con vector vacío pBI321. (B) Cuantificación del crecimiento en sal, expresado como la elongación de la raíz primaria (cm) tras 10 días de crecimiento en medio MS suplementado con 50 mM de NaCl. Los valores representan el promedio de la elongación radicular de 3-6 plántulas independientes de cada línea. Naranja, dos líneas independientes de plántulas mutantes *sos1-1* expresando AtSOS1 silvestre; Azul, ocho líneas independientes de mutantes *sos1-1* expresando el antiportador mutante puntual SOS1-S1136A/S1138A; Verde, mutante *sos1-1* transformado con vector vacío.

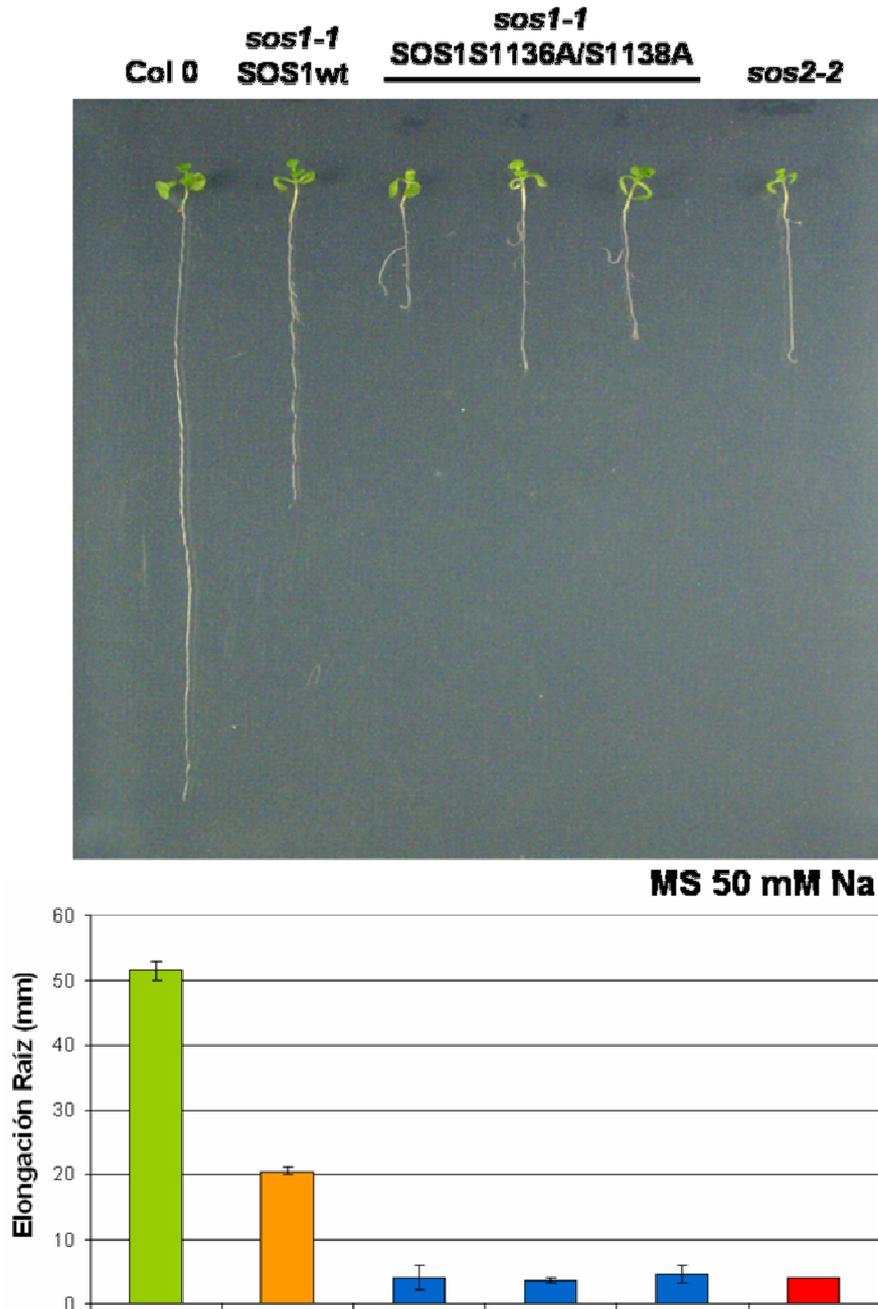


Figura 16. Estudio comparativo de la halotolerancia de plántulas de *Arabidopsis* mutantes *sos2-2* y transgénicas *sos1-1* expresando el antiportador no fosforilable SOS1-S1136A/S1138A. (A) Plántulas de cinco días germinadas en MS se transfirieron a placas del mismo medio suplementadas con 50 mM de NaCl y se fotografiaron transcurridos 10 días de tratamiento salino. De izquierda a derecha, silvestre *Columbia gll*; mutante *sos1-1* expresando AtSOS1 silvestre desde el promotor *CaMV35S*; tres líneas transgénicas independientes de mutantes *sos1-1* expresando el antiportador SOS1-S1136A/S1138A bajo el control del mismo promotor; mutante *sos2-2*. (B) Cuantificación del crecimiento en sal, expresado como la elongación de la raíz primaria (mm) tras 10 días de crecimiento en medio MS suplementado con 50 mM de NaCl. Los valores representan el promedio de la elongación radicular de 3-6 plántulas independientes de cada línea. Verde, silvestre Col 0; Naranja, mutante *sos1-1* expresando AtSOS1 silvestre; Azul, tres líneas transgénicas independientes de mutantes *sos1-1* expresando el antiportador SOS1-S1136A/S1138A; Rojo, mutante *sos2-2*.

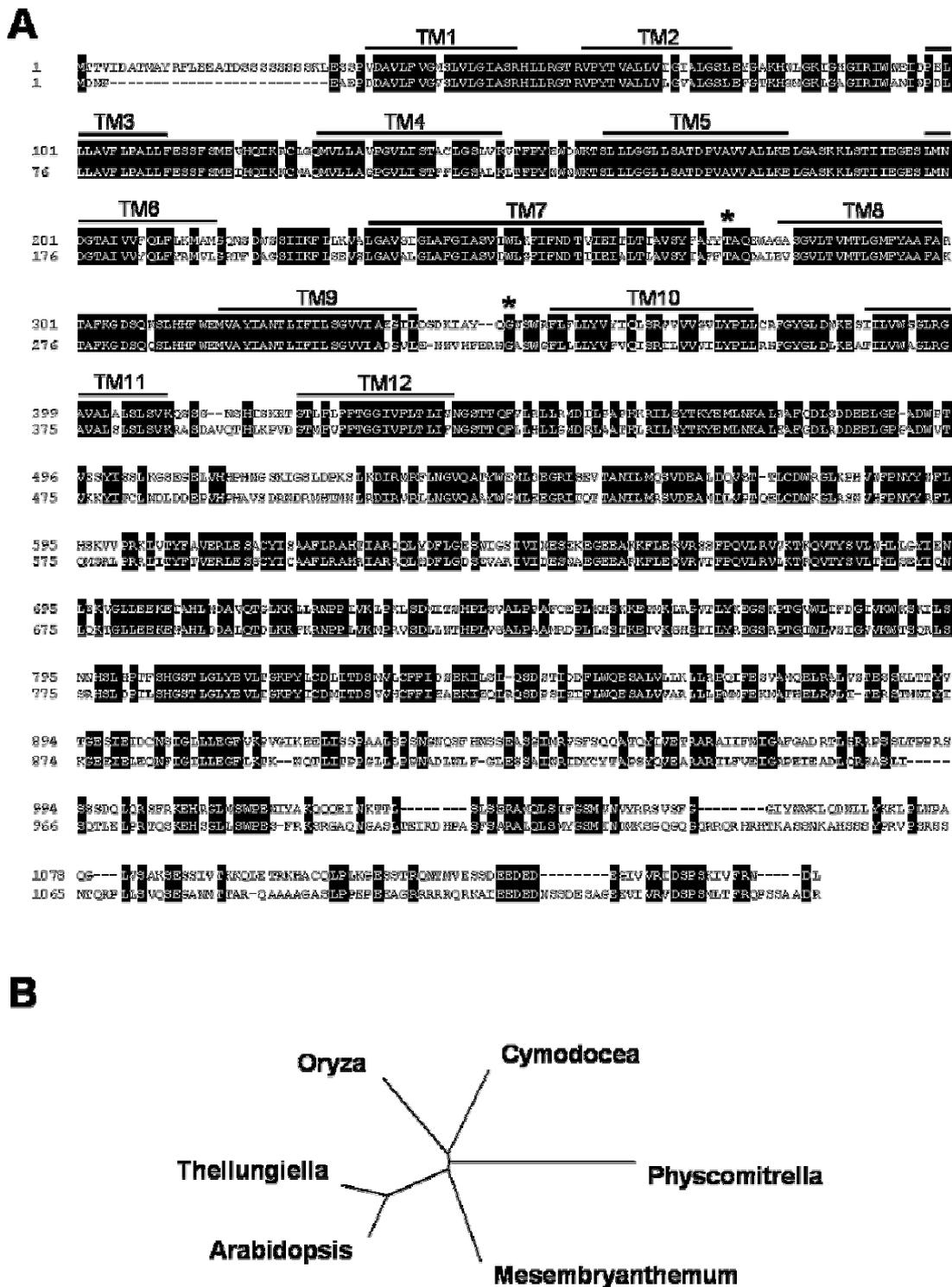


Figura 17. Análisis filogenético de los homólogos de SOS1 de varias especies de plantas. (A) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas SOS1 de *Arabidopsis* (secuencia superior) y *Oryza* (secuencia inferior) realizado con el programa CLUSTAL-X (Thompson *et al.*, 1997). Los residuos idénticos se destacan en negro. Los segmentos subrayados (TM1-TM12) se corresponden con 12 segmentos transmembranales que se predicen para el intercambiador SOS1 mediante el análisis bioinformático de hidrofobicidad. Las posiciones marcadas con asteriscos indican la situación de los intrones no procesados eliminados de la secuencia de ADNc de OsSOS1. **(B)** Arbol filogenético representativo de las distancias evolutivas mediante alineamiento de los péptidos homólogos de SOS1 de varias especies vegetales (*A.thaliana* Acc. E84431, *O. sativa* Acc. C71771, *Physcomitrella patens* Acc.CAD91921, *Cymodocea nodosa* Acc. CAD20320, *Thellungiella halophila* y *Mesembryanthemum crystallinum* cedidos por PoroykoV. y Bohnert H.).

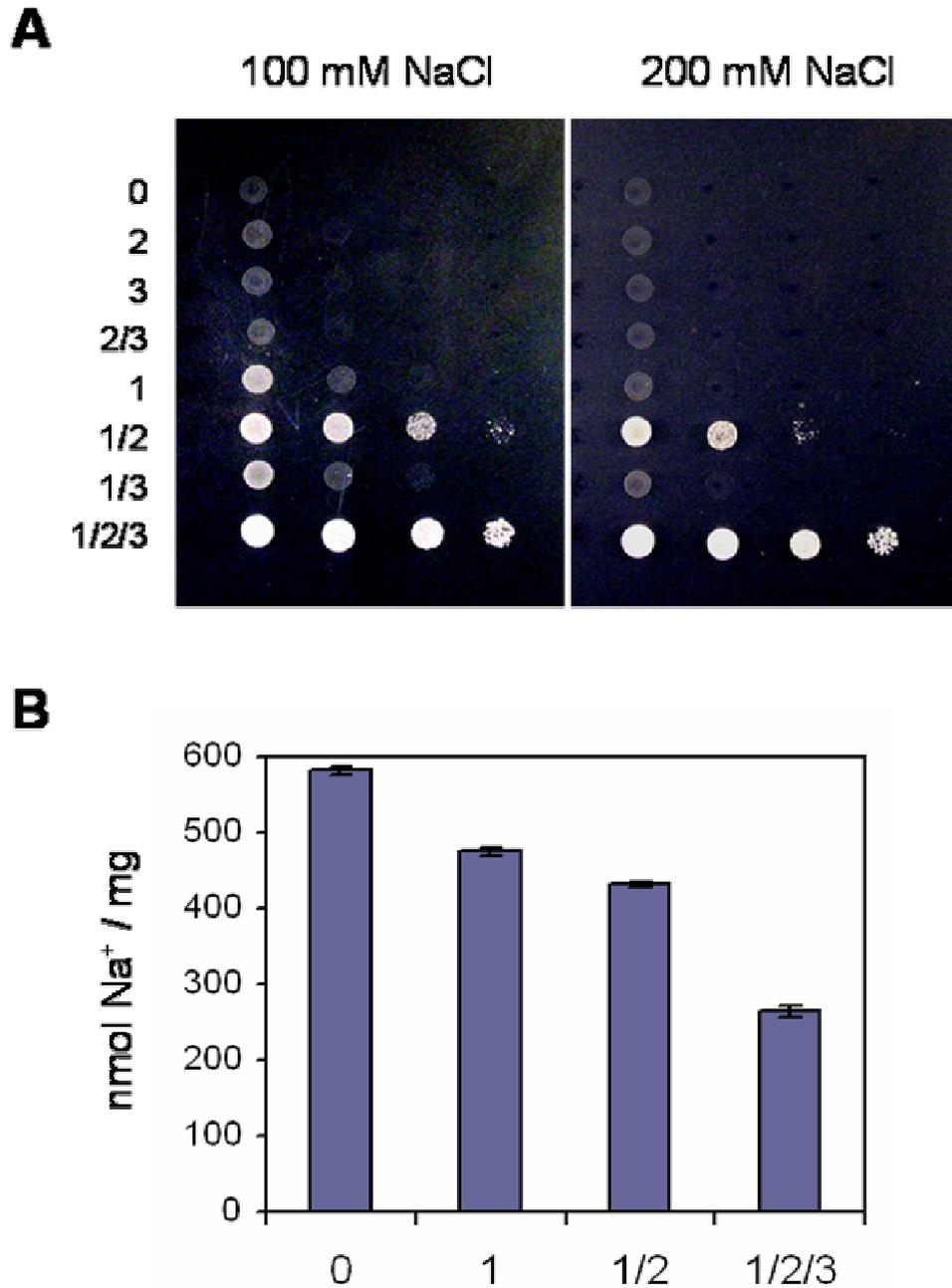


Figura 18. Activación de OsSOS1 por el complejo kinasa SOS2/SOS3 de *Arabidopsis*. (A) Transformantes de levadura AXT3K o con la combinación indicada de genes SOS (1, OsSOS1; 2, AtSOS2; 3, AtSOS3) se cultivaron en medio YNB líquido hasta saturación. Cinco μL de diluciones decimales seriadas se distribuyeron en placas de medio AP suplementado con 1mM de KCl y 100 ó 200 mM de NaCl, y las placas se incubaron a 28°C durante 3 días. Los plásmidos utilizados para la expresión de las proteínas SOS son: pDR195 para OsSOS1, pFL2T para AtSOS2, pFL3T para AtSOS3 y pFL32T para la co-expresión de AtSOS2 y AtSOS3. (B) El contenido intracelular de Na⁺ se determinó mediante Espectrometría de Emisión Atómica. Transformantes de levadura AXT3K con vector vacío (0) o con la combinación indicada de genes SOS (1, OsSOS1; 2, AtSOS2; 3, AtSOS3) se crecieron en medio AP suplementado con 1mM de KCl y 30 mM de NaCl, y cuando la $\text{DO}_{600\text{nm}} \sim 0,2-0,3$ se recolectaron por filtración. Los valores representados son el promedio de las medidas realizadas a tres cultivos independientes de cada combinación de genes SOS. Las unidades se expresan en nanomoles de Na⁺ por miligramo de peso seco de células.

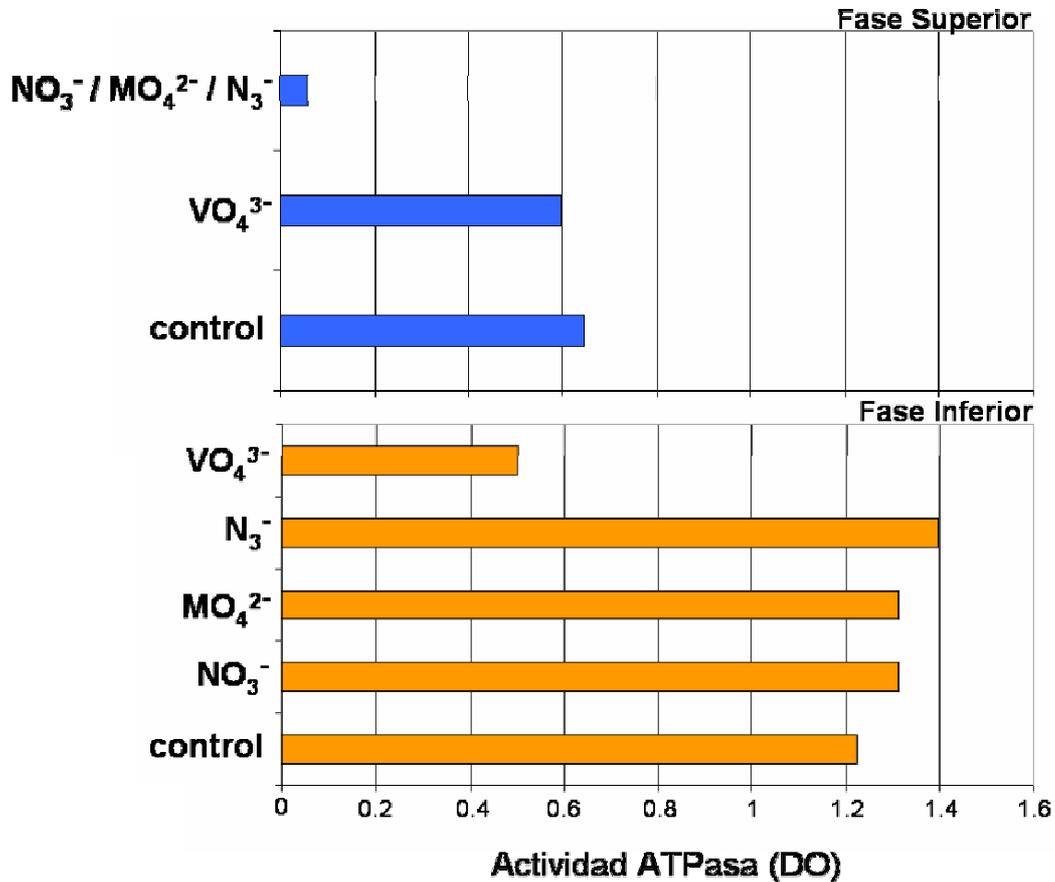


Figura 19. Determinación de la pureza de la preparación de vesículas membrana plasmática. La pureza de la preparación de membrana plasmática de levadura (fase inferior y superior) se cuantificó mediante la medida de la actividad ATPasa en presencia de inhibidores, como se describe en el apartado III.8.G.1. El vanadato (VO_4^{3-}) es un inhibidor específico de ATPasas de tipo P, como la protón ATPasa de membrana plasmática. El nitrato (NO_3^-) inhibe a las ATPasas de tipo V, como las vacuolares, la azida (N_3^-) inhibe a las ATPasas de tipo F0/F1, como las mitocondriales. El molibdato (MoO_4^{2-}) es un inhibidor inespecífico de fosfatasas y se usa para reducir el fondo de liberación de fosfato que no se deba a ATPasas.

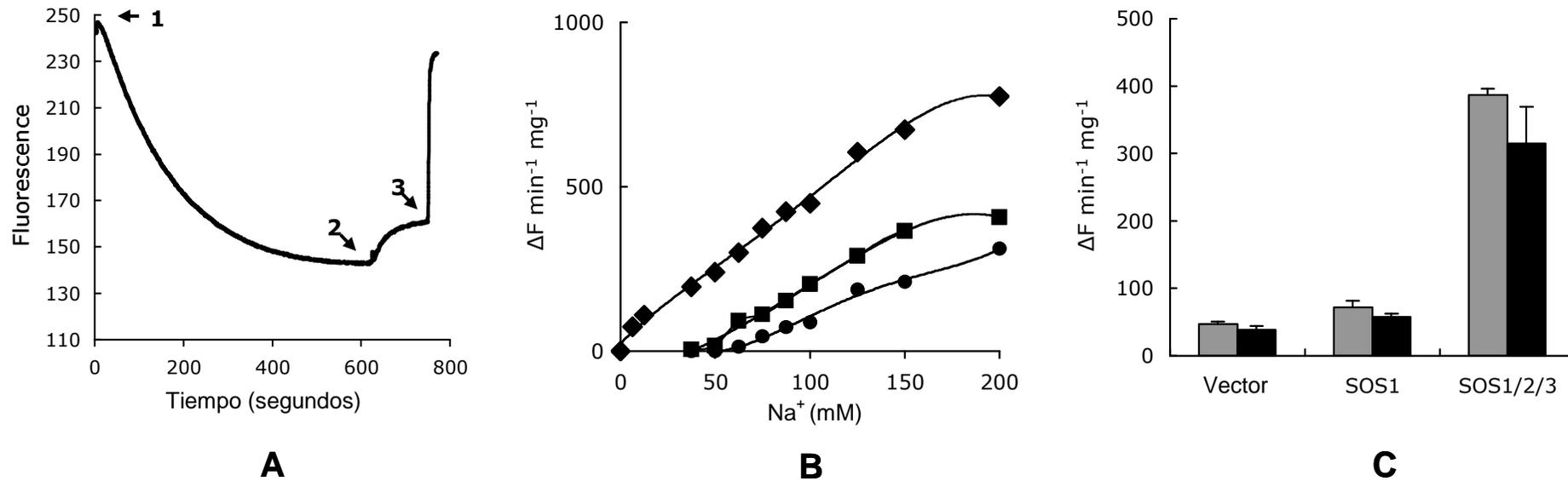


Figura 20. Actividad antiportadora Na^+/H^+ de OsSOS1. (A) Formación dependiente de ATP de un gradiente de pH en vesículas de membrana plasmática aisladas de células de levadura expresando el antiportador de arroz OsSOS1. Tras la adición de ATP se produce un gradiente de pH (ΔpH), ácido en el interior de las vesículas (flecha 1). Una vez alcanzado el estado estacionario se añadieron sales de sodio (flecha 2) y el aumento de la fluorescencia observado (indicativo del intercambio de H^+) se monitorizó durante 2 minutos, tras los cuales el gradiente de pH se interrumpió por la adición de 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (flecha 3). La fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias. (B) Intercambio Na^+/H^+ en función de la concentración de Na_2SO_4 y de la presencia de OsSOS1 y del complejo kinasa de *Arabidopsis* SOS2/SOS3. Círculos, transformantes AXT3K con vector vacío pDR195; Cuadrados, transformantes AXT3K expresando OsSOS1 solo; Rombos, transformantes AXT3K expresando las tres proteínas SOS (OsSOS1, AtSOS2 y AtSOS3). El intercambio Na^+/H^+ se expresa como la disipación del gradiente preformado de pH por minuto y miligramo de proteína de membrana. (C) Especificidad del intercambio de protones inducido por Na^+ . El ión Na^+ se añadió a una concentración final de 75 mM como sulfato (barras grises) y como gluconato (barras negras). Los valores representan el promedio de la disipación del ΔpH por minuto y miligramo de proteína de membrana, de muestras triplicadas.

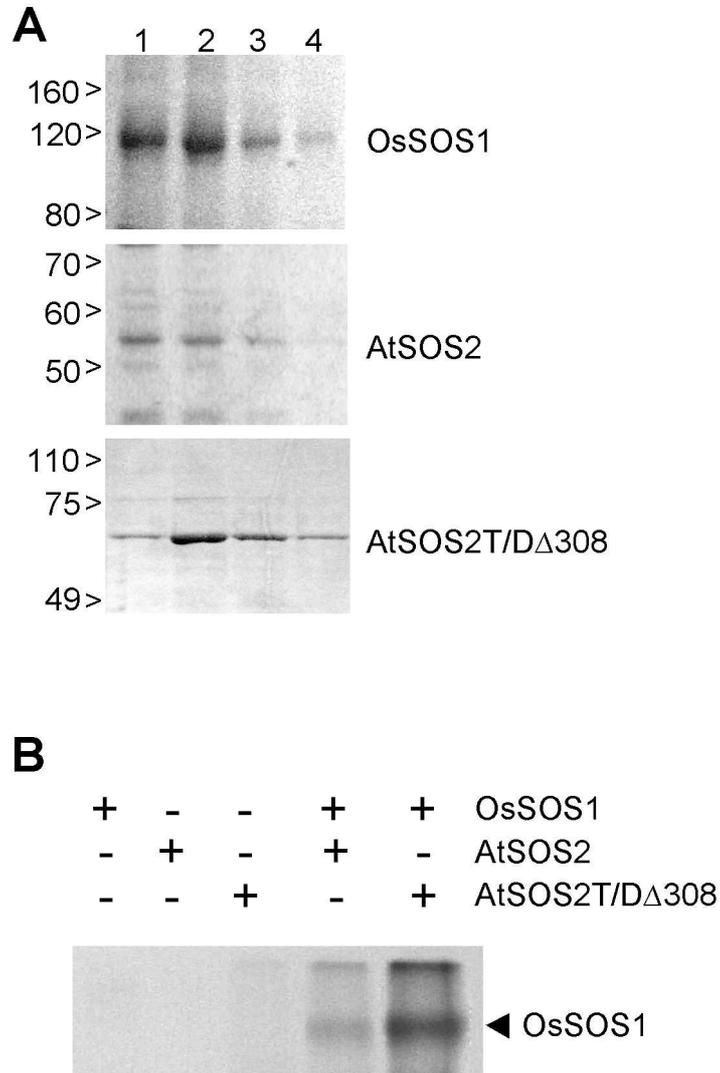


Figura 21. Fosforilación de OsSOS1 por la kinasa de SOS2 *Arabidopsis*. Las proteínas recombinantes OsSOS1, AtSOS2 (etiquetadas con histidinas) y AtSOS2T/D Δ 308 (fusionada a GST) se aislaron por cromatografía de afinidad y la pureza de las preparaciones se ensayó mediante el desarrollo en un gel SDS-PAGE de alícuotas de los cuatro primeros eluatos (1 a 4) de purificación (**A**). Se indican las bandas correspondientes a las proteínas OsSOS1:His6x (128 kDa), AtSOS2:His6x (52 kDa) y GST: SOS2T/D Δ 308 (60 kDa). A la izquierda se marcan las referencias de la escalera de pesos moleculares. (**B**) Las proteínas purificadas se combinaron como se indica en el buffer de fosforilación, tal y como se describe en materiales y métodos (Apartado III.8.E.). Alícuotas de las reacciones de fosforilación se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE y se autoradiografiaron. La flecha indica la banda de 128 kDa correspondiente al antiportador de arroz OsSOS1 fosforilado.

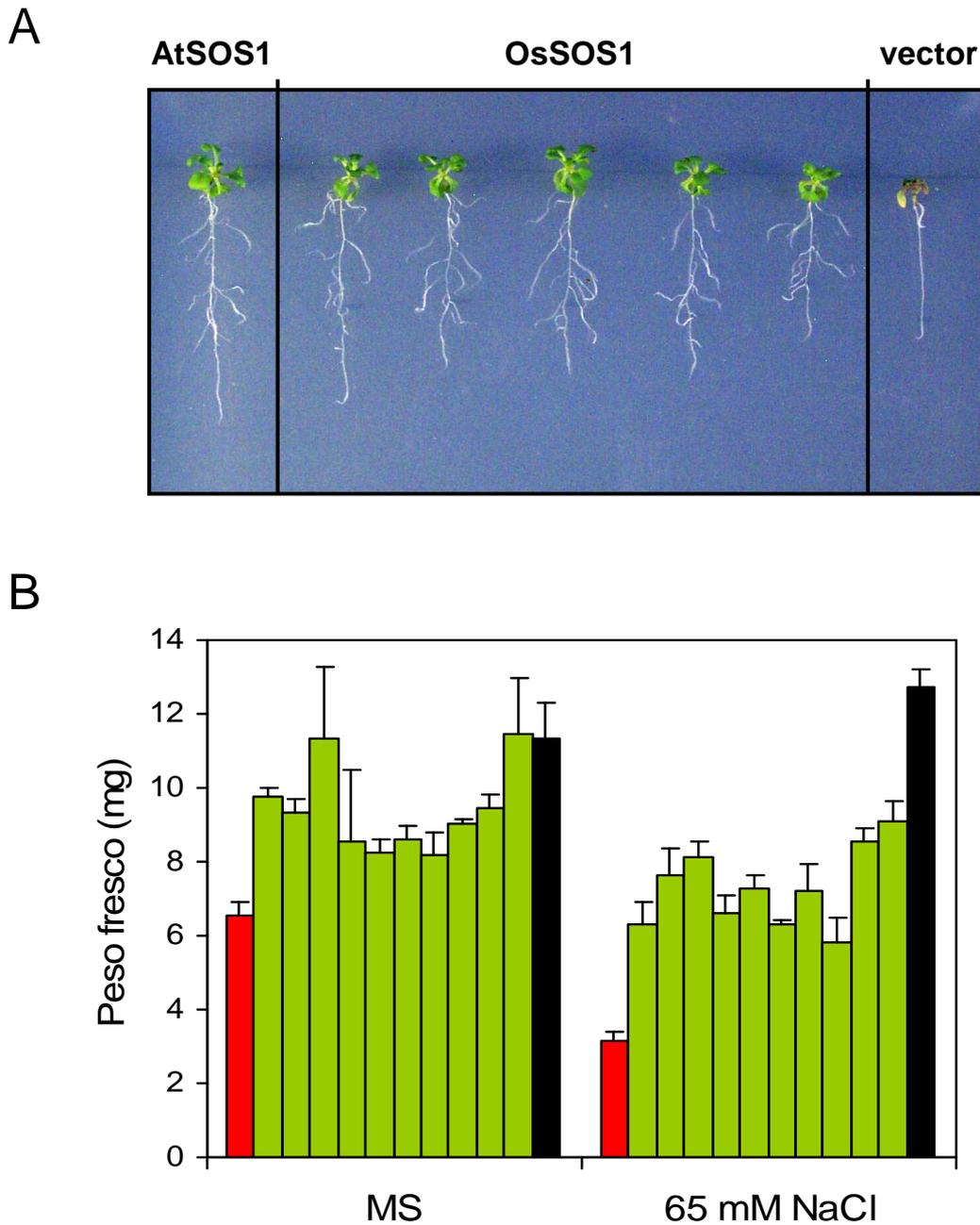


Figura 22. Complementación del mutante de *Arabidopsis sos1-1* por el antiportador de arroz OsSOS1. (A) Plántulas de cinco días germinadas en MS se transfirieron a placas del mismo medio suplementadas con 50 mM de NaCl y se fotografiaron transcurridos 14 días de tratamiento salino. Izquierda, mutante *sos1-1* expresando AtSOS1 silvestre desde el promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor. Centro, cinco líneas transgénicas independientes de mutantes *sos1-1* expresando el antiportador de arroz OsSOS1 bajo el control del mismo promotor 35S. Derecha, mutante *sos1-1* transformado con vector vacío pBI321. (B) Cuantificación del crecimiento en sal, expresado como el peso fresco (mg) tras 14 días de crecimiento en medio MS suplementado y sin suplementar con 65 mM de NaCl. Los valores representan el promedio del peso fresco de 3-6 plántulas independientes de cada línea. Rojo, mutante *sos1-1* transformado con vector vacío pBI321; Verde, diez líneas transgénicas independientes de mutantes *sos1-1* expresando el antiportador de arroz OsSOS1; Negro, mutante *sos1-1* expresando el antiportador de *Arabidopsis* AtSOS1.

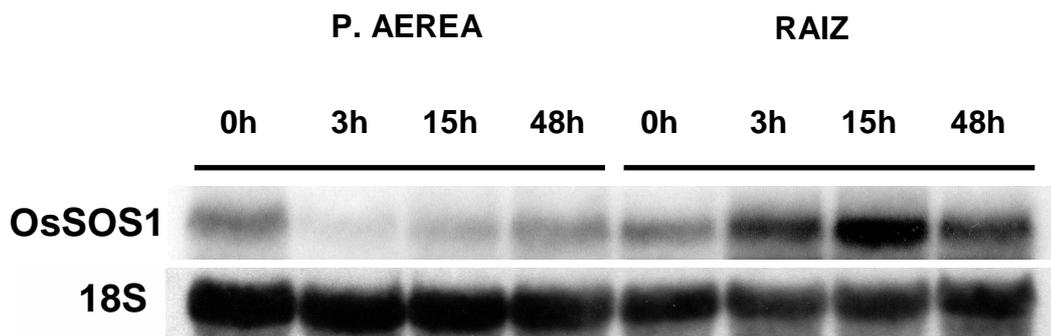


Figura 23. Abundancia del transcrito *OsSOS1* en respuesta al estrés salino. RNA total purificado de raíces y parte aérea de plantas de arroz (*Oryza sativa* cv *Nipponbare*) sometidas a un choque salino con 100 mM NaCl en medio hidropónico durante 0, 3, 15 y 48 horas, se resolvió en un gel de agarosa-formamida y se hibridó con una sonda específica para *OsSOS1*. Las intensidades relativas se normalizaron por re-hibridación de la membrana con una sonda de ADN correspondiente al fragmento de 18S del ARN ribosomal.

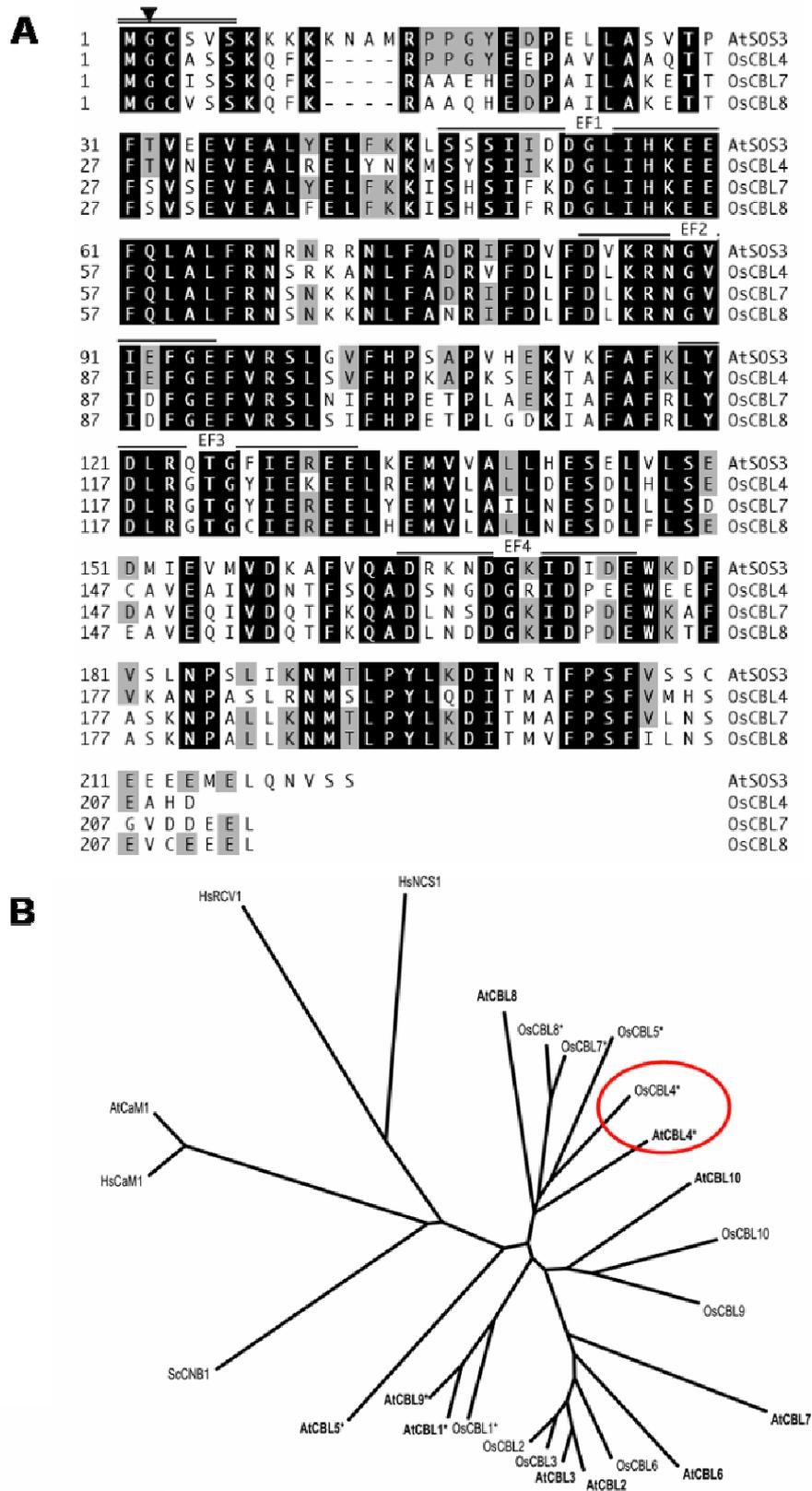


Figura 24. Alineamiento de secuencias de AtSOS3 y OsCBL4-7-8 (A) y cladograma de la familia de CBLs de *A. thaliana* y *O. sativa* (B). Los residuos conservados en las tres isoformas en relación a AtSOS3 se destacan en negro. Los residuos conservados aunque no en todas las isoformas se destacan en gris. El segmento marcado con una doble línea indica la secuencia consenso de N-miristoilación (MGXXXS) y la flecha apunta al residuo de glicina donde presumiblemente se une el radical miristoílo. Los segmentos subrayados y resaltados en amarillo EF1 a EF4 indican los dominios putativos EF-hand responsables de la unión a Ca^{++} .

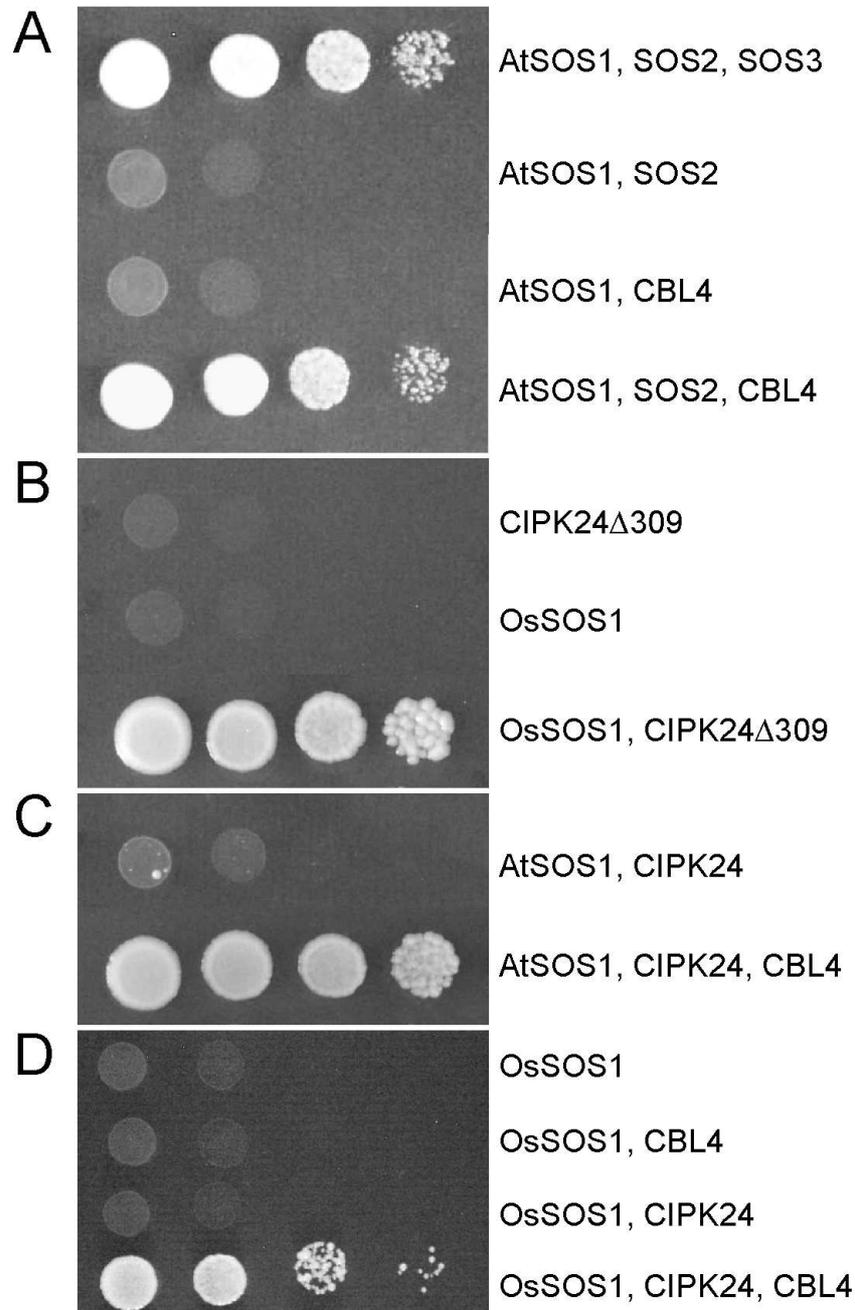


Figura 25. Interacciones funcionales entre las proteínas SOS de *Arabidopsis* y sus equivalentes de arroz. Las cepas de levadura YP890, portando integrado el casete de expresión $PGK1_{PRO}:AtSOS1:CYC1_{TER}$ (**A**, **C**), YP1021, con la integración análoga $PMA1_{PRO}:OsSOS1:ADH1_{TER}$ del ADNc de SOS1 de arroz (**D**) y AXT3K transformada con el plásmido pSOS1-1 para la expresión de AtSOS1 (**B**) se transformaron con vectores para dirigir la expresión de las proteínas regulatorias SOS2 y SOS3 de *Arabidopsis* o CIPK24 y CBL4 de arroz, como se indica en cada caso. CIPK24 Δ 309 alberga una delección carboxiterminal que origina una kinasa constitutiva. Los transformantes de levadura se cultivaron en medio YNB líquido hasta saturación. Cinco μ L de diluciones decimales seriadas se distribuyeron en placas de medio AP suplementado con 1mM de KCl y 200 mM de NaCl, y se incubaron a 28°C durante 3-4 días.

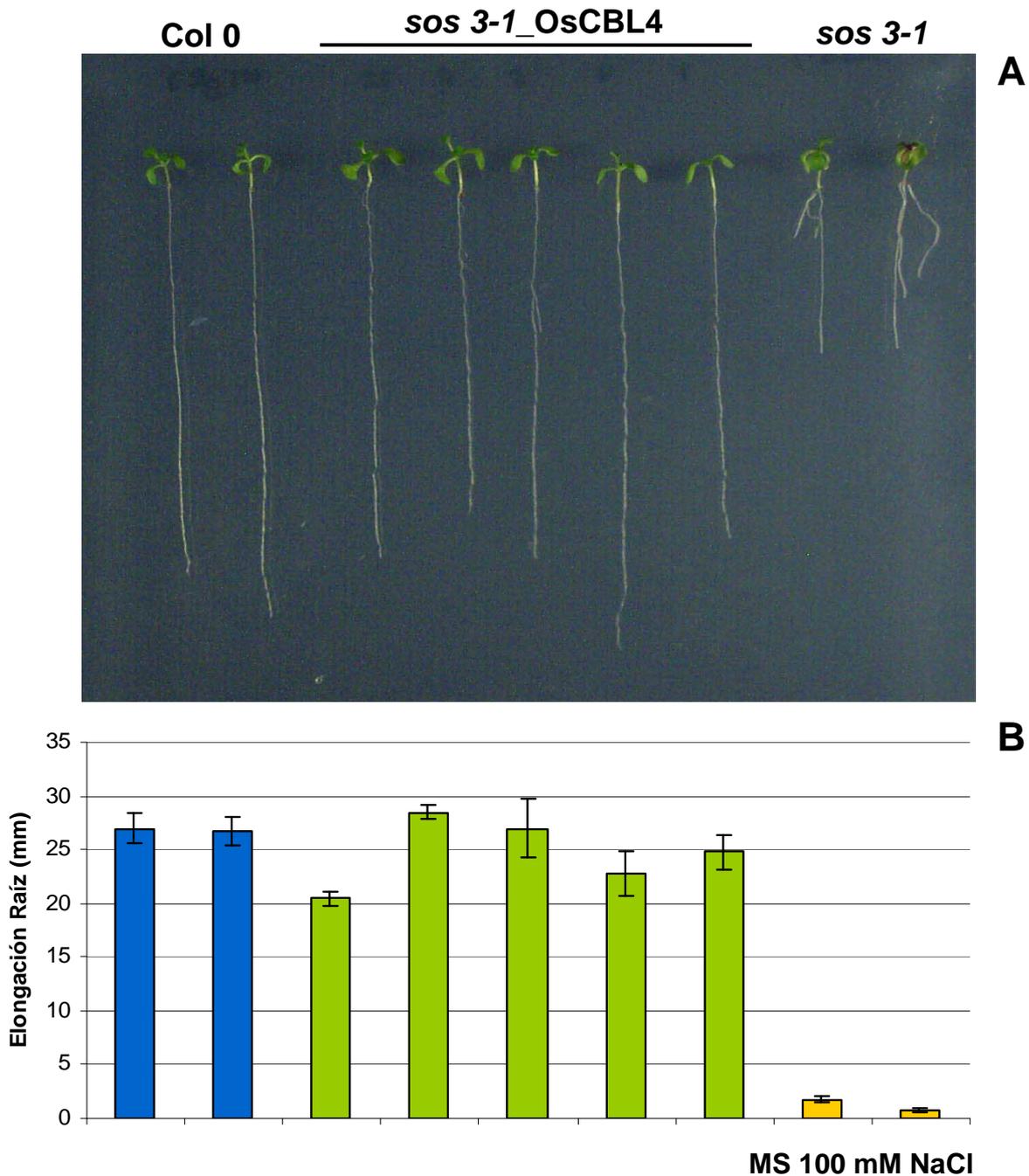


Figura 26. Complementación del mutante de *Arabidopsis sos3-1* con el sensor de arroz OsCBL4. (A) Plántulas de cinco días germinadas en MS se transfirieron a placas del mismo medio suplementadas con 100 mM de NaCl y se fotografiaron transcurridos 10 días de tratamiento salino. Izquierda, dos líneas silvestres (*Col0 gl1*) transformadas con vector vacío pBI321. Centro, cinco líneas transgénicas independientes de mutantes *sos3-1* expresando el sensor de arroz OsCBL4 bajo el control del promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor. Derecha, dos líneas transgénicas independientes de mutantes *sos3-1* transformados con vector vacío pBI321. (B) Cuantificación del crecimiento en sal, expresado como la elongación de la raíz primaria (mm) tras 10 días de crecimiento en medio MS suplementado con 100 mM de NaCl. Los valores representan el promedio de la elongación radicular de 3-6 plántulas independientes de cada línea; Naranja, dos líneas independientes de mutantes *sos3-1* transformados con vector vacío pBI321. Verde, cinco líneas independientes de mutantes *sos3-1* expresando el sensor de arroz OsCBL4; Azul, dos líneas independientes de plántulas silvestres (*Col0 gl1*) transformadas con vector vacío pBI321.

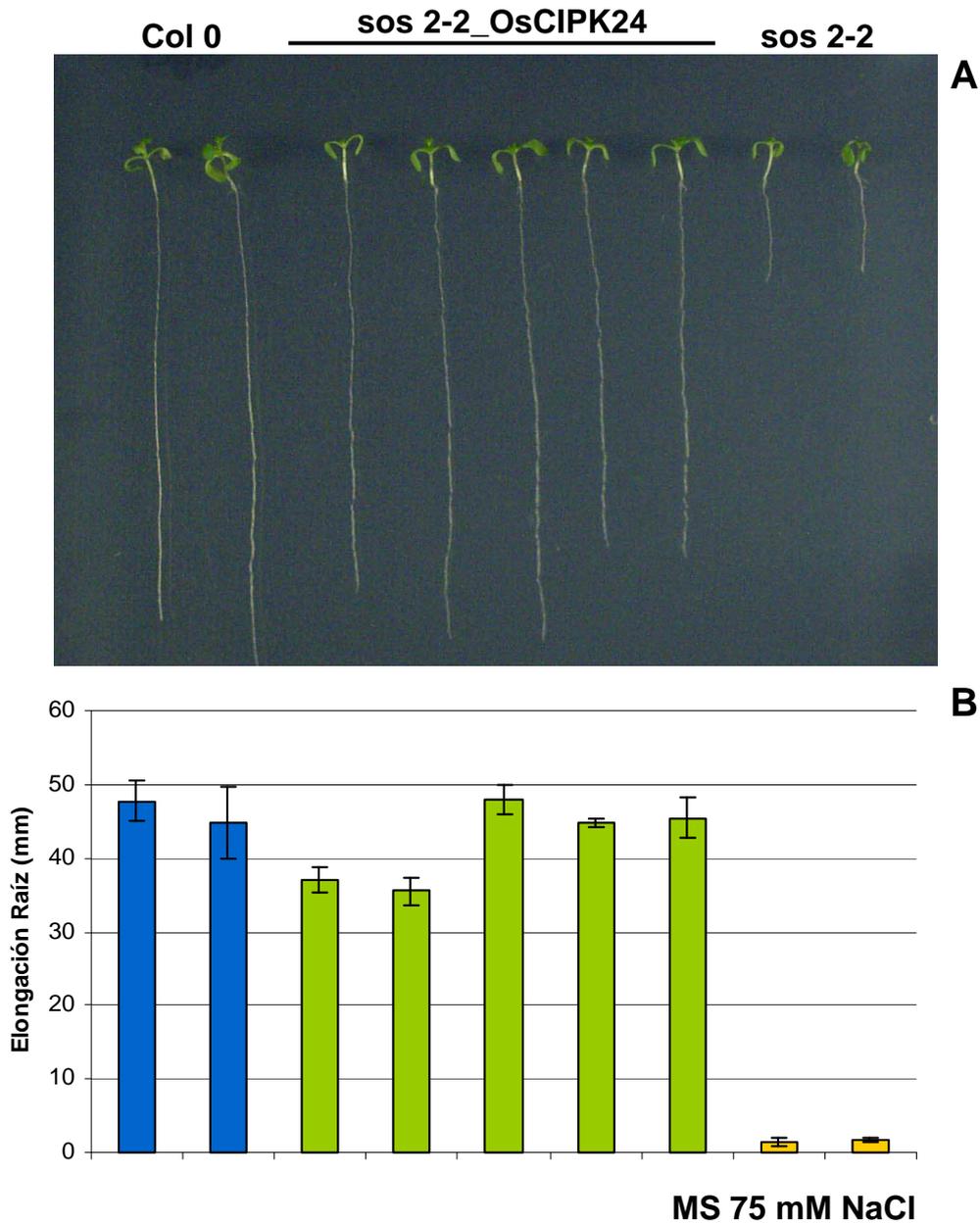


Figura 28. Complementación del mutante de *Arabidopsis sos2-2* con la kinasa de arroz OsCIPK24. (A) Plántulas de cinco días germinadas en MS se transfirieron a placas del mismo medio suplementadas con 75 mM de NaCl y se fotografiaron transcurridos 10 días de tratamiento salino. Izquierda, dos líneas silvestres (*Col0 gl1*) transformadas con vector vacío pBI321. Centro, cinco líneas transgénicas independientes de mutantes *sos2-2* expresando la kinasa de arroz OsCIPK24 bajo el control del promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor. Derecha, dos líneas transgénicas independientes de mutantes *sos2-2* transformados con vector vacío pBI321. (B) Cuantificación del crecimiento en sal, expresado como la elongación de la raíz primaria (mm) tras 10 días de crecimiento en medio MS suplementado con 75 mM de NaCl. Los valores representan el promedio de la elongación radicular de 3-6 plántulas independientes de cada línea; Naranja, dos líneas independientes de mutantes *sos2-2* transformados con vector vacío pBI321. Verde, cinco líneas independientes de mutantes *sos2-2* expresando la kinasa de arroz OsCIPK24; Azul, dos líneas independientes de plántulas silvestres (*Col0 gl1*) transformadas con vector vacío pBI321.

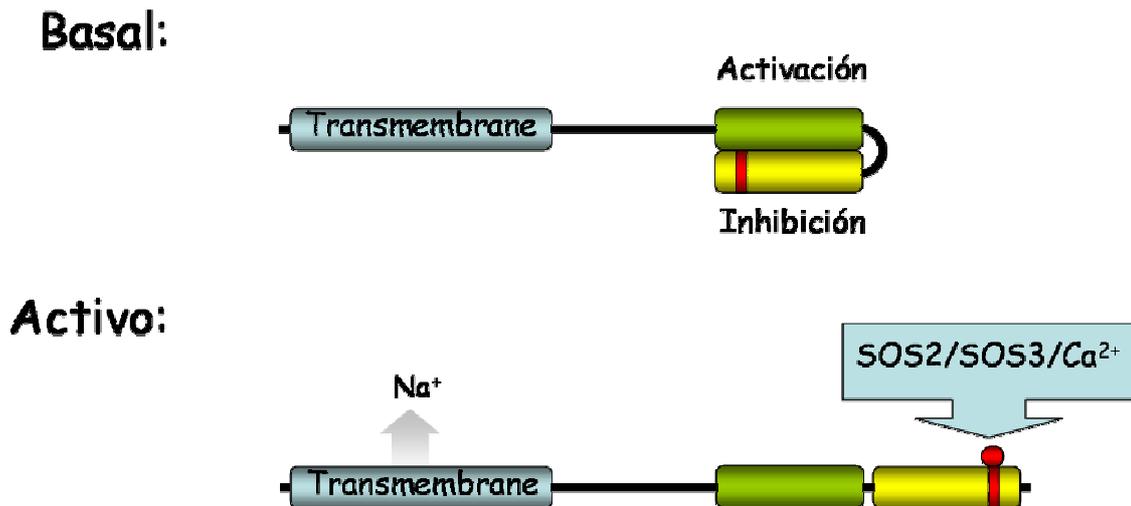


Figura 29. Modelo de activación del antiportador SOS1 de *Arabidopsis*. En el estado basal, SOS1 se encuentra autoinhibido por la interacción entre sus dominios carboxiterminales de activación e inhibición. Cuando una señal de calcio promueve la formación del complejo kinasa SOS2/SOS3 y se produce la fosforilación del residuo de serina 1138 en el dominio autoinhibitorio de SOS1, un cambio conformacional tiene lugar en el antiportador que libera al dominio activador de la interacción y promoviendo de este modo el eflujo de Na^+ .

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 lac</i> {F' <i>proAB lacI^q ZDM15Tn10</i> (tetR)}	Bullock <i>et al.</i> , 1987
XL10 gold	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a	Stratagene
ER2925	<i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>	NewEngland Biolabs
BL21	<i>hsdS gal</i> (λ cIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7</i> gene1)	Studier <i>et al.</i> ,1986

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas.

Componentes Inorgánicos (mg/L)			
Macronutrientes		Micronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650.0	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂	332.2	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
MgSO ₄	180.7	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
KNO ₃	1900.0	Na ₂ -EDTA	37.26
KH ₂ PO ₄	170.0	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
		MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
		KI	0.83
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Componentes Orgánicos (mg/L)			
Mio-Inositol		100.0	
A. Nicotínico		1.0	
Piridoxina·HCl		1.0	
Tiamina·HCl		10.0	

Tabla 2. Composición del medio MS(1X) para el crecimiento de plantas.

Vectores de Clonaje					
Vector	Referencia	Replicación	Marcador	Usos	
pBluescript II SK (+/-)	Stratagene	Bacterias	Ampicilina	Conservación y replicación de genes y fragmentos de DNA.	
pCR [®] 2.1	Invitrogen	Bacterias	Ampicilina/Kanamicina		
pCR [®] Blunt II TOPO	Invitrogen	Bacterias	Kanamicina		

Vectores de Expresión					
Vector	Referencia	Replicación	Marcador	Promotor/Terminador	Usos
pGEX2TK	GE healthcare	Bacterias	Ampicilina	<i>tac</i>	Expresión en bacterias de proteínas de fusión a GST.
pEG(KT)	Mitchell <i>et al.</i> , 1993	Levaduras (multicopia)/Bacterias	URA3/Ampicilina	<i>CYC1</i>	Expresión en levaduras de proteínas de fusión a GST.
pDR195	Rentsch <i>et al.</i> , 1995	Levaduras (multicopia)/Bacterias	URA3/Ampicilina	<i>PMA1/ADH1</i>	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> de genes exógenos.
pYPGE15	Brunelli <i>et al.</i> , 1993	Levaduras (multicopia)/Bacterias	URA3/Ampicilina	<i>PGK1/CYC1</i>	
p414GPD	Mumberg <i>et al.</i> , 1995	Levaduras(monocopia)/Bacterias	TRP1/Ampicilina	<i>GPD/CYC1</i>	
pFLT	Quintero <i>et al.</i> , 2002	Levaduras(monocopia)/Bacterias	TRP1/Ampicilina	<i>ADH1</i> y/o <i>PMA1</i>	

Vectores Binarios					
Vector	Referencia	Replicación	Marcador	Promotor/Terminador	Usos
pBI321	Martínez-Atienza <i>et al.</i> , 2006	Plantas/Bacterias	Kanamicina	<i>CaMV35S/NOS</i>	Expresión estable en plantas de <i>Arabidopsis</i> de genes exógenos mediante transformación con <i>A. tumefaciens</i>

Tabla 3: Vectores utilizados.

Genotipo	Cla I	Nae I
S1136A/S1138A	-	+
S1136A	-	-
S1138A	+	+
S1136D/S1138D	+	-
Silvestre	+	-

Tabla 4: Restricción enzimática específica de los mutantes puntuales de fosforilación.