

# TESIS DOCTORAL

## **Regulación de la homeostasis iónica en plantas por el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> SOS1**

Presentada por:

D. Carlos Tello Lacal.

Dirigida por:

Prof D. José Manuel Pardo Prieto.

Dr. D. Francisco Javier Quintero Toscano.

## 0. ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
I.1. El problema de la salinidad en la producción agrícola.....	1
I.2. Efectos fisiológicos producidos por el estrés salino sobre las plantas.....	2
I.3. Respuestas adaptativas de las plantas frente al estrés salino.....	4
I.3.1. Adaptaciones a nivel celular a altas concentraciones de Na <sup>+</sup> .....	4
I.3.1. Adaptaciones a nivel de planta completa a altas concentraciones de Na <sup>+</sup> .....	7
I.4. Transducción de señales en respuesta a estrés salino.....	11
I.5. El transporte iónico en el mantenimiento de la homeostasis y la tolerancia a estrés.....	19
I.6. Transporte de K <sup>+</sup> en la planta.....	22
I.6.1. Absorción de K <sup>+</sup> de alta y baja afinidad.....	22
I.6.2. Carga de K <sup>+</sup> en el xilema.....	24
I.6.3. Recirculación floemática de K <sup>+</sup> .....	25
I.6.4. Regulación de la transpiración mediante apertura y cierre estomático.....	26
I.7. Transporte de Na <sup>+</sup> en la planta.....	28
I.7.1. Absorción de Na <sup>+</sup> .....	28
I.7.1.1. Mecanismos sensibles a Ca <sup>2+</sup> .....	28
I.7.1.2. Mecanismos insensibles a Ca <sup>2+</sup> .....	29
I.7.1.3. Vía apoplástica.....	31
I.7.2. Compartimentación de Na <sup>+</sup> en la vacuola.....	32
I.7.3. Expulsión y transporte a larga distancia de Na <sup>+</sup> .....	35
I.7.3.1. SOS1: filogenia y características.....	38
I.7.3.2. Regulación del sistema SOS.....	38
I.7.3.3. Interacción de la ruta SOS con la nutrición de K <sup>+</sup> .....	42
I.7.3.4. Sobreexpresión de SOS1 y mejora de la tolerancia a salinidad.....	44
I.7.3.5. Ruta SOS y estrés oxidativo.....	45
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
M.1. Material biológico.....	49
M.1.1. Bacterias.....	49
M.1.1.1. Cepas de bacterias utilizadas.....	49
M.1.1.2. Medios y condiciones de crecimiento.....	50
M.1.2. Levaduras.....	52
M.1.2.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas.....	52
M.1.2.2. Medios y condiciones de crecimiento de levaduras.....	53
M.1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	53
M.1.3.1. Líneas utilizadas.....	53
M.1.3.2. Cultivo de plantas en suelo.....	53
M.1.3.3. Cultivo de plantas <i>in vitro</i> .....	55

M.1.3.4. Cultivo de plantas en medio líquido.....	56
M.1.3.5. Cultivo de plantas en hidropónico.....	56
M.2. Purificación y análisis de DNA.....	57
M.2.1. Purificación de DNA.....	57
M.2.1.1. Minipreparación de DNA plasmídico bacteriano.....	57
M.2.1.1.1. Minipreparación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	57
M.2.1.1.2. Minipreparación de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> .....	57
M.2.1.2. Extracción de DNA de plantas.....	58
M.2.2. Cuantificación del DNA.....	58
M.2.3. Precipitación del DNA.....	58
M.2.4. Electroferesis de DNA en geles de agarosa.....	59
M.2.5. Extracción de bandas de DNA en geles de agarosa.....	59
M.2.6. Manipulación enzimática del DNA.....	59
M.2.6.1. Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	59
M.2.6.2. Desfosforilación de los extremos 5' del DNA.....	59
M.2.6.3. Generación de extremos romos del DNA.....	60
M.2.6.4. Ligación de fragmentos de DNA.....	60
M.2.6.5. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR con Taq polimerasa.....	60
M.2.6.6. PCR con DNA polimerasa de alta fidelidad.....	61
M.2.6.7. Mutagénesis dirigida mediante PCR.....	61
M.2.7. Mutagénesis aleatoria de plásmidos in vivo.....	61
M.3. Purificación y análisis de RNA.....	62
M.3.1. Extracción de RNA total de plantas.....	62
M.3.2. Electroforesis de RNA.....	62
M.3.3. Cuantificación de RNA.....	63
M.3.4. RT-PCR.....	63
M.4. Transformación de los distintos organismos utilizados.....	63
M.4.1. Transformación de <i>E. coli</i> .....	63
M.4.1.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	63
M.4.1.2. Transformación de células de <i>E. coli</i> competentes por choque térmico.....	64
M.4.1.3. Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> .....	64
M.4.1.4. Transformación de células de <i>E. coli</i> competentes por electroporación.....	64
M.4.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .....	65
M.4.2.1. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> .....	65
M.4.2.2. Transformación de células de <i>A. tumefaciens</i> competentes por choque térmico.....	65
M.4.2.3. Preparación de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> .....	66

M.4.2.4. Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> por electroporación.....	66
M.4.3. Transformación de levaduras.....	66
M.4.4. Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> .....	67
M.4.4.1. Preparación de las células de <i>A. tumefaciens</i> .....	67
M.4.4.2. Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i> .....	67
M.4.4.3. Selección de transformantes y propagación.....	68
M.4.4.4. Presencia, expresión y número de copias del transgén.....	68
M.4.4.4.1. Presencia.....	68
M.4.4.4.2. Expresión.....	68
M.4.4.4.3. Número de copias.....	69
M.4.4.5. Fijación de líneas transgénicas homocigotos.....	69
M.5. Obtención de líneas de dobles mutantes mediante cruzamiento clásico.....	69
M.6. Caracterización de transformantes de levadura.....	69
M.7. Caracterización fisiológica de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	70
M.7.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido.....	70
M.7.2. Ensayos de crecimiento en medio salino líquido.....	70
M.7.3. Determinación del contenido en clorofila.....	70
M.7.4. Ensayos en cultivo hidropónico.....	70
M.7.5. Medida de contenidos iónicos.....	71
M.8. Secuenciación.....	71
M.9. Herramientas informáticas.....	71
M.9.1. Programas informáticos.....	71
M.9.2. Herramientas de Internet.....	72
<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
R.1. La actividad del antiportador SOS1 controla otras funciones en la planta, además del transporte de Na <sup>+</sup> .....	73
R.1.1. Función del antiportador SOS1 en la homeostasis de K <sup>+</sup> . Interacción funcional entre SOS1 y AKT1.....	73
R.1.1.1. Crecimiento del mutante <i>sos1-1</i> en ausencia total de Na <sup>+</sup> .....	73
R.1.1.2. Obtención y genotipado del doble mutante <i>akt1 sos1</i> .....	74
R.1.1.3. Caracterización fisiológica del mutante <i>akt1</i> y del doble mutante <i>akt1 sos1</i> en cultivo hidropónico.....	76
R.1.1.4. Determinación de los contenidos iónicos.....	78
R.1.2. Expresión en planta y levadura de un alelo de <i>SOS1</i> mutado en el residuo conservado de ácido aspártico en posición 201 que inhabilita el transporte de Na <sup>+</sup> .....	82
R.1.2.1. Caracterización funcional del alelo mutado <i>SOS1_D201N</i> en levadura.....	82

R.1.2.2. Transformación de la línea <i>sos1-1</i> de Arabidopsis con el alelo <i>SOS1_D201N</i> .....	84
R.1.2.3. Caracterización funcional del alelo <i>SOS1_D201N</i> frente a salinidad en la línea mutante <i>sos1-1</i> de Arabidopsis.....	85
R.1.2.4. Caracterización funcional del alelo <i>SOS1_D201N</i> frente a estrés oxidativo en la línea mutante <i>sos1-1</i> de Arabidopsis.....	87
R.2. Búsqueda y expresión de alelos hiperactivos de <i>SOS1</i> en Arabidopsis.....	89
R.2.1. Complementación de la mutación <i>sos1-1</i> con los alelos mutados.....	90
R.2.2. Expresión <i>in vitro</i> de candidatos a alelos hiperactivos en plantas silvestres de Arabidopsis.....	95
R.2.3. Análisis del nivel de expresión del transgén por RT-PCR semicuantitativa.....	105
R.2.4. Ensayos en cultivo hidropónico.....	106
R.2.6. Determinación de los contenidos iónicos.....	108
R.2.7. Rastreo de alelos hiperactivos de <i>SOS1</i> en Arabidopsis.....	111
R.2.8. Secuenciación del transgén en los candidatos seleccionados.....	113
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
D.1. Intervención del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ <i>SOS1</i> en la homeostasis de $\text{K}^+$ .....	117
D.2. Caracterización de un alelo de <i>SOS1</i> mutado en un aminoácido muy conservado.....	120
D.3. Búsqueda de alelos hiperactivos de <i>SOS1</i> .....	121
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>131</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>159</b>
Anexo 1. Abreviaturas.....	159
Anexo 2. Oligonucleótidos utilizados.....	160

# I INTRODUCCIÓN.

## I.1 El problema de la salinidad en la producción agrícola.

La salinidad de los suelos es un factor abiótico que conlleva graves consecuencias para la agricultura, ya que limita la producción de los cultivos e impide el potencial uso agrícola de suelos no cultivados previamente (Munns, 2002; Flowers, 2004). Un suelo se define como salino cuando la conductividad eléctrica del extracto de saturación es de al menos 4 dS/m, lo que equivale a una concentración de NaCl (la sal más común en los suelos) de 40 mM y que genera una presión osmótica de 0.2 MPa (Munns y Tester, 2008). La salinidad afecta a  $\sim 10^9$  ha de la superficie terrestre total (Szabolcs, 1994; Tester y Davenport, 2003), habiéndose estimado que un 20% de la superficie agrícola y un 50% de la superficie de regadío se encuentran salinizadas (Flowers y Yeo, 1995; Yokoi *et al.*, 2002a). La salinización de los suelos se produce de forma natural por la meteorización de rocas o por la deposición de sales oceánicas arrastradas con el viento y el agua (Munns y Tester, 2008). En regiones áridas y semiáridas, la alta insolación y la baja pluviometría contribuyen a concentrar las sales en el suelo y sólo mediante el cultivo en regadío se puede mejorar la productividad agrícola. Desgraciadamente, la irrigación suele agravar el problema de la salinización del suelo, especialmente cuando se usa agua de poca calidad y el drenaje es insuficiente (Bressler y Hoffman, 1986; Ghassemi *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1996). Unas prácticas agrícolas adecuadas pueden corregir el proceso (riego con aguas de alta calidad, instalación de sistemas de drenaje, rectificación de la sodicidad del suelo mediante la adición de óxido o sulfato cálcico...), si bien el coste de estas medidas resulta inviable en la mayoría de terrenos (Tester y Davenport, 2003).

Otra posible solución al problema de la baja productividad de los cultivos en suelos salinos es el uso de cultivares halotolerantes. En la naturaleza existen especies halofitas, que resisten concentraciones salinas de hasta 500 mM, y glicofitas, que son sensibles a alta salinidad e incluyen a la mayoría de especies cultivadas (Hasegawa *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003). En general, ambos tipos de especies comparten mecanismos de resistencia al estrés salino y sólo se diferencian en el perfil de expresión de los genes implicados (Hasegawa *et al.*, 2000; Cushman y Bonhert, 2000). Como ejemplo ilustrativo, la especie halofita *Thehungiella salsuginea*, cuyo genoma muestra una homología del 90-95% con el de *Arabidopsis thaliana*, induce constitutivamente más de 40 genes que en *Arabidopsis* sólo se expresan en condiciones de estrés (Taji *et al.*, 2004). La investigación en mejora de la halotolerancia se dirige a la mejor comprensión de los efectos causados por el estrés salino, tanto a nivel celular como de organismo completo, así como de las respuestas adaptativas de las plantas frente a dicho estrés. Para ello es necesario identificar tanto los componentes que determinan la tolerancia a sal como los elementos reguladores de éstos. (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001b).

## **I.2. Efectos fisiológicos producidos por el estrés salino sobre las plantas.**

A diferencia de otros organismos pluricelulares, las plantas son organismos sésiles. La imposibilidad de escapar cuando las condiciones del medio no son las adecuadas las obliga a desarrollar mecanismos de respuesta frente a todo tipo de estrés abiótico: térmico, hídrico y salino. Los efectos fisiológicos producidos por el estrés salino en plantas derivan de sus dos componentes principales: el desajuste osmótico y la toxicidad iónica. De estos efectos primarios derivan un conjunto de efectos secundarios como son el estrés oxidativo, deficiencias en la absorción de otros iones (principalmente  $K^+$ ), disminución del crecimiento celular, reducción de la evapotranspiración y disminución de la eficiencia fotosintética (Niu *et al.*, 1995; Zhu, 2001a; Zhu, 2002; Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008).

### **Estrés osmótico.**

El exceso de sales provoca una drástica reducción en el potencial osmótico del suelo, dificultando la absorción de agua por las plantas. En unas pocas horas, el menor contenido hídrico causa una reducción transitoria en el crecimiento de hojas y raíces. Se produce una alteración en las relaciones hídricas de las células, ya que éstas responden a la falta de agua en el citosol (necesaria para las reacciones metabólicas) aportándola desde la vacuola. De este modo, las células pierden turgencia y reducen su expansión. Además, las plantas minimizan la deshidratación cerrando los estomas para evitar la pérdida de agua por evapotranspiración. El cierre estomático disminuye la toma de  $CO_2$ , lo que disminuye la fijación de esta molécula por fotosíntesis (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001b, 2002; Munns *et al.*, 2002).

### **Toxicidad iónica y desequilibrio electroquímico.**

La homeostasis es la tendencia de un organismo a mantener su estado interno a pesar de los cambios en su entorno. En condiciones fisiológicas, las concentraciones homeostáticas de iones en el citoplasma son de 100-200 mM  $K^+$ , 1-10 mM  $Na^+$  y  $Cl^-$ , y 100-200 nM  $Ca^{2+}$  (Niu *et al.*, 1995). El exceso de NaCl en el medio durante episodios de estrés salino causa fuertes desequilibrios en la homeostasis iónica, que la célula debe reestablecer para su crecimiento y funcionamiento metabólico (Binzel *et al.*, 1988). Dada la similitud en las propiedades fisicoquímicas entre el  $Na^+$  y el  $K^+$ , el primero actúa como inhibidor competitivo en los sitios específicos de enzimas que requieren la unión de  $K^+$  como cofactor. La célula necesita mantener siempre un alto cociente  $K^+:Na^+$ , ya que concentraciones de  $Na^+$  superiores a 100 mM en el citoplasma inhiben procesos bioquímicos y fisiológicos (Bhandal y Malik, 1988; Marschner, 1995; Serrano *et al.*, 1996). Procesos celulares esenciales como la síntesis de proteínas, el procesado del RNA o el metabolismo de azúcares se ven fuertemente inhibidos en presencia de altas concentraciones de  $Na^+$  (Marschner, 1995; Blaha *et al.*, 2000; Forment *et al.*, 2002). Además, concentraciones salinas superiores a 400 mM rompen el equilibrio electrostático necesario para el mantenimiento de las estructuras terciarias y cuaternarias de

las proteínas, produciendo la inhibición de la mayor parte de la actividad enzimática por desnaturalización (Wyn-Jones y Pollard, 1983).

### **Estrés oxidativo.**

El estrés salino produce daños oxidativos por la sobreacumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) como los radicales superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) o los radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), producidos de forma natural en procesos aeróbicos como el transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias o la oxidación de metabolitos (Smirnoff *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1994; Borsani *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2001). El exceso de ROS causa daños oxidativos en lípidos de membrana plasmática, proteínas y ácidos nucleicos (Smirnoff *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2001). Las plantas degradan las ROS mediante antioxidantes no enzimáticos, como el ascorbato, glutatión, flavonoides, alcaloides y carotenoides, o enzimas detoxificadoras como la superóxido dismutasa, catalasa o pertenecientes al ciclo del ascorbato-glutatión (Chinnusamy *et al.*, 2004; Apel y Hirt, 2004).

### **Deficiencia en la toma de $\text{K}^+$ .**

El  $\text{K}^+$  es un elemento esencial para la célula, ya que interviene en el ajuste osmótico, regula los movimientos estomáticos y actúa como cofactor en diversas enzimas (Hasegawa *et al.*, 2000). El  $\text{Na}^+$  compite con el  $\text{K}^+$  por los sitios de unión a los sistemas de transporte de alta y baja afinidad, contribuyendo a disminuir el cociente  $\text{K}^+:\text{Na}^+$  de la célula (Rains y Epstein, 1967; Maathuis *et al.*, 1996). Los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC) se han postulado como una posible fuente de entrada de iones  $\text{Na}^+$  en la raíz (Amtmann y Sanders, 1999; Tyerman y Skerret, 1999; Zhu *et al.*, 2003; Rus *et al.*, 2004). Además, la acumulación de  $\text{Na}^+$  en la célula produce depolarización de la membrana plasmática, impidiéndose la entrada pasiva de  $\text{K}^+$  a través de canales rectificadores de entrada a la vez que se favorece su salida por canales rectificadores de salida. Finalmente, la síntesis de solutos compatibles usados en la osmoprotección celular consume mucho ATP, que ya no puede ser utilizado para el transporte activo de  $\text{K}^+$  de alta afinidad (Shabala *et al.*, 2003; Shabala y Cuin, 2007).

### **Otros efectos secundarios del estrés salino.**

Incluyen la desregulación de la fotosíntesis, el cierre estomático, la detención del crecimiento celular y la activación de muerte celular programada. (Serrano *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2003). Además, parece existir una relación entre estrés salino y genotoxicidad, como se desprende del hallazgo del mutante de *Arabidopsis* *uvs66*, que es sensible tanto a agentes genotóxicos como al estrés salino (Albinsky *et al.*, 1999).



### **I.3. Respuestas adaptativas de las plantas frente al estrés salino.**

Tanto las enzimas de plantas halofitas como las de glicofitas son sensibles a altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma, por lo que ambos tipos de especies han desarrollado una serie de procesos de adaptación que se desencadenan en presencia de este tipo de estrés (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2003). Las respuestas adaptativas a alta salinidad se pueden dividir en dos grupos: adaptaciones a nivel celular y adaptaciones a nivel de planta completa.

#### **I.3.1. Adaptaciones a nivel celular a altas concentraciones de $\text{Na}^+$ .**

##### **Regulación de la homeostasis.**

La entrada de  $\text{Na}^+$  en la célula produce la ruptura de su homeostasis iónica y osmótica. Cuando la concentración de  $\text{Na}^+$  en el medio extracelular aumenta, se crea un gradiente de concentraciones de este catión a ambos lados de la membrana plasmática que unido a la diferencia de potencial favorece su entrada pasiva en la célula, pudiendo producirse la apoptosis si se acumula en exceso (Niu *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1999). En las plantas superiores, la homeostasis iónica se reestablece principalmente con la ayuda de los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que expulsan el  $\text{Na}^+$  de la célula o lo compartimentan en la vacuola (Xiong y Zhu, 2002). La energía para el transporte de cationes proviene del gradiente de protones generado por la  $\text{H}^+$ -ATPasa de tipo P en la membrana plasmática o la  $\text{H}^+$ -ATPasa de tipo V y la  $\text{H}^+$ -pirofosfatasa en la vacuola (Blumwald *et al.*, 2000). El primer antiportador identificado en plantas fue AtNHX1, una proteína vacuolar que muestra la misma afinidad por el transporte de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{K}^+/\text{H}^+$ . Tanto por homología en su secuencia como por presentar la misma afinidad por ambos cationes, es muy similar a ScNHX1 de levadura (Nass *et al.*, 1997; Venema *et al.*, 2002; Barragán *et al.*, 2012). La sobreexpresión de esta proteína o de la  $\text{H}^+$ -pirofosfatasa AVP1 demostraron mejorar la tolerancia de Arabidopsis (Apse *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 2001) y tomate (Zhang *et al.*, 2001) frente a estrés salino. La expulsión de  $\text{Na}^+$  de la célula se lleva a cabo a través del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática SOS1 (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002), cuya sobreexpresión también mejora la tolerancia a salinidad en Arabidopsis (Shi *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009).

La acumulación de iones en el lumen vacuolar disminuye su potencial osmótico hacia valores más negativos. Para mantener el mismo potencial osmótico a ambos lados del tonoplasto, las plantas sintetizan osmolitos compatibles y los acumulan en el citoplasma (Tester y Davenport, 2003). Los osmolitos compatibles se pueden acumular en la célula sin alterar la bioquímica intracelular e incluyen elementos esenciales como el  $\text{K}^+$ , azúcares simples (glucosa, fructosa...), alcoholes de azúcares (glicerol e inosítoles metilados), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa y fructanos), derivados cuaternarios de aminoácidos (prolina, glicina-betaína,  $\beta$ -alanina-betaína, prolina-betaína...), aminas terciarias (ectoína) y compuestos de sulfonio (sulfato de colina, propionato de dimetilsulfonio...) (Bohnert y Jensen, 1996; Nuccio *et al.*, 1999). Finalmente, las acuaporinas son canales de agua localizados en la membrana

plasmática y vacuolar que permiten la entrada de  $\sim 10^6$  moléculas de agua por segundo en presencia de una diferencia osmótica de 100 mM (Chrispeels et al., 1999). Su fosforilación por kinasas de membrana dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , favorecida a potenciales hídricos altos, incrementa su permeabilidad para favorecer el flujo de agua en la célula (Johansson et al., 1996).

### **Detoxificación del estrés oxidativo.**

El estrés salino y otros tipos de estrés abiótico generan ROS, que se pueden detoxificar mediante la producción de enzimas o la síntesis de osmolitos protectores (Hasegawa et al., 2000). La producción de plantas transgénicas sobreexpresando algunas de las enzimas detoxificadoras, como la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa o glutatión reductasa resultó en la mejora de la tolerancia a salinidad (Allen et al., 1997; Roxas et al., 1997; Bohnert y Sheveleva, 1998). La síntesis de proteínas protectoras como las osmotinas y dehidrinas, que mantienen la estructura de las proteínas a elevada salinidad, o las LEA (del inglés, *Late Embryogenesis Abundant*), que parecen contrarrestar el componente osmótico del estrés salino y también se han implicado en la respuesta a patógenos, se induce en episodios de estrés (Ingram y Bartels, 1996; Campbell y Close, 1997; Munns et al., 2002; Brini et al., 2011; Salleh et al., 2012). La sobreexpresión constitutiva de proteínas LEA de cebada mejoró la halotolerancia en plantas transgénicas de arroz (Xu et al., 1996).

A menudo los osmolitos compatibles se acumulan a concentraciones demasiado bajas como para permitirles participar en el reajuste osmótico, por lo que se cree que su papel se centra en la degradación de ROS y la protección de las estructuras celulares frente a daños oxidativos (Hong et al., 2000; Zhu, 2001a; Krassensky y Jonas, 2012). Algunos de estos solutos compatibles son aminoácidos. La prolina es un aminoácido esencial en la protección frente al daño celular ocasionado por todo tipo de estrés, ya que se acumula como osmolito, degrada ROS y estabiliza la estructura de las proteínas actuando como chaperona (Hare y Cress, 1997; Verbruggen y Hermans, 2008; Szabados y Saviouré, 2010). El estrés abiótico induce la síntesis de prolina mediante la reducción de glutamato a semialdehído de glutamato por la enzima P5C sintasa (P5CS) seguida de su reducción a prolina por la P5C reductasa. En ausencia de estrés, se favorece su degradación a glutamato por las enzimas mitocondriales prolina deshidrogenasa y P5C deshidrogenasa (revisado en Szabados y Saviouré, 2010). La sobreexpresión de P5CS en tabaco y petunia produjo plantas tolerantes a salinidad y sequía por acumulación de prolina (Kishor et al., 1995; Hong et al., 2000; Yamada et al., 2005), mientras que el mutante *p5cs-1* de Arabidopsis mostraba hipersensibilidad a estrés abiótico (Szekely et al., 2008). El ácido  $\gamma$ -butírico (GABA) es un aminoácido no proteico que se acumula en situaciones de estrés. Tras ser sintetizado en el citosol es transportado a la mitocondria, donde es degradado a ácido succínico que se incorpora al ciclo de Krebs (Shelp et al., 1999; Fait et al., 2008). El metabolismo del GABA es esencial para la tolerancia a estrés en las plantas. La disrupción de la GABA transaminasa produjo plantas de Arabidopsis hipersensibles

a estrés mientras la de la semialdehído succínico deshidrogenasa produjo plantas enanas e hipersensibles a luz UV-B y estrés térmico por sobreacumulación de ROS (Bouche *et al.*, 2003; Renault *et al.*, 2010).

Existe una correlación positiva entre niveles de poliaminas y tolerancia a estrés. Las más comunes en plantas superiores son la putrescina, la espermidina y la espermina. Aunque no se conoce bien su función específica, se han relacionado con la protección de membranas y la reducción del estrés oxidativo (Groppa y Benavides, 2008; Alcázar *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2011). La baja producción de putrescina por pérdida de función de las enzimas ADC1 y ADC2 redujo la tolerancia de las plantas a todo tipo de estrés, mientras su sobreexpresión produjo plantas hiper-resistentes a sequía, salinidad y frío (Capell *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2004; Cuevas *et al.*, 2008; Alcázar *et al.*, 2010). Algunas plantas son capaces de producir en respuesta a estrés abiótico glicina-betaína, compuesto cuaternario de amonio que estabiliza membranas, protege frente al daño oxidativo y puede funcionar en el ajuste osmótico de la célula (Rhodes y Hanson, 1993; Chen y Murata, 2011). La sobreexpresión de genes de síntesis de este compuesto en especies que no lo producen de forma natural, especialmente si se dirige al cloroplasto, mejora su tolerancia a condiciones de estrés abiótico (Park *et al.*, 2007).

También distintos tipos de hidratos de carbono pueden funcionar como osmolitos compatibles. Muchas angiospermas de regiones frías utilizan los fructanos como azúcares de reserva. Son polímeros ramificados formados por transferencia de fructosa a moléculas de sacarosa (Vijn y Smeekens, 1999). La sobreexpresión de fructosil transferasas en tabaco y arroz produjo plantas transgénicas en las que la producción de fructanos mejoró su tolerancia a frío, bajas temperaturas y sequía (Pilon-Smits *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2007; Kawakami *et al.*, 2008). En presencia de estrés, aumenta la hidrólisis de almidón por  $\beta$ -amilasas. Las plantas de *Arabidopsis* deficientes en esta ruta de degradación mostraron mayor sensibilidad a frío y estrés osmótico (Yano *et al.*, 2005; Valerio *et al.*, 2011). La trehalosa es un disacárido no reductor que se acumula en plantas resistentes a desecación, funcionando como osmolito y protector de membranas y proteínas (Paul *et al.*, 2008). La expresión heteróloga de genes de síntesis de este azúcar de *E. coli* y *S. cerevisiae* mejoró la tolerancia a sequía, salinidad y alta temperatura en diversas especies vegetales (Iordachescu e Imai, 2008). En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de distintas isoformas de trehalosa-6-fosfato sintasa propias y de arroz produjo plantas tolerantes a sequía, salinidad y frío (Avonce *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011), mientras que la pérdida de función redujo su termotolerancia (Suzuki *et al.*, 2008). También los oligosacáridos de la familia de la rafinosa se acumulan en diversas especies vegetales durante episodios de desecación y se cree que actúan protegiendo membranas y degradando ROS (Peterbauer y Richter, 2001; Hinch, 2003; Nishizawa *et al.*, 2008). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* produciendo elevados niveles de galactinol y rafinosa mostraron mayor resistencia a sequía y salinidad (Taji *et al.*, 2002; Nishizawa *et al.*, 2008). Los polioles también están implicados en la estabilización de moléculas y en la prevención del daño oxidativo por degradación de radicales hidroxilo (Smirnoff y Cumbes, 1989; Shen *et al.*, 1997). La sobreexpresión de enzimas de

biosíntesis de mio-inositol y sus derivados cíclicos mejoró la tolerancia a salinidad en plantas transgénicas de tabaco (Sheveleva *et al.*, 1997; Majee *et al.*, 2004; Patra *et al.*, 2010).

Finalmente, la identificación en *Arabidopsis* del mutante hiperresistente a estrés salino y oxidativo *pst1* pone de manifiesto la importancia de la protección frente al daño oxidativo para mejorar la tolerancia al estrés salino, ya que esta mutación consiste en la inactivación de un regulador negativo de la respuesta a este tipo de estrés (Tsugane *et al.*, 1999).

### **1.3.2. Adaptaciones a nivel de planta completa a altas concentraciones de Na<sup>+</sup>.**

#### **Regulación del transporte de Na<sup>+</sup>.**

El mantenimiento de un alto cociente K<sup>+</sup>:Na<sup>+</sup> en la parte aérea es esencial para la supervivencia de la mayoría de especies cuando se someten a estrés salino (Gorham *et al.*, 1990; Dubcovsky *et al.*, 1998; Cuin *et al.*, 2003), por lo que la planta debe regular de una forma precisa el transporte de Na<sup>+</sup> a través de procesos como la carga en el xilema desde la raíz, la descarga en hojas para su compartimentación o la recirculación desde la parte aérea a la raíz para su expulsión (Munns *et al.*, 2002)(ver apartado 1.7).

El Na<sup>+</sup> entra por la raíz de forma pasiva a través de uniportadores y canales, siendo los principales candidatos los transportadores de alta afinidad HKT y los canales no selectivos de cationes (NSCC) (Highinbotham, 1973; Rubio *et al.*, 1995; Schachtman *et al.*, 1997; Amtmann y Sanders, 1999; Rus *et al.*, 2001; Mäser *et al.*, 2002; Garcideblás *et al.*, 2003; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Horie *et al.*, 2007). El principal mecanismo de las plantas glicofitas para evitar la toxicidad sódica es la exclusión de este catión, siendo el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> SOS1 la principal proteína implicada (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002). Una vez en la raíz, el Na<sup>+</sup> difunde radialmente por el apoplasto hacia el córtex hasta llegar a barreras impermeables como la banda de Caspari (Niu *et al.*, 1995; Steudle, 2000). La endodermis suele presentar discontinuidades en zonas como el ápice de la raíz o el inicio de raíces secundarias, que son aprovechadas para la entrada de Na<sup>+</sup> a través de la vía apoplástica. Este mecanismo es particularmente relevante en algunas especies como el arroz (Yeo *et al.*, 1987; Yadav, *et al.*, 1996), mientras en el resto la entrada de iones en el periciclo de la raíz se produce mayoritariamente por la vía simplástica. El estrés salino favorece la rápida maduración de la banda de Caspari en raíces de algodón, mientras que el crecimiento en condiciones de alta humedad y baja transpiración produce la formación de raíces con endodermis más permeables (Hose *et al.*, 2001; Enstone *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis*, la carga de Na<sup>+</sup> en el xilema parece ser un proceso activo llevado a cabo por el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> SOS1 (Shi *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002). El uniportador HKT1;1, por su parte, se encarga de la descarga de Na<sup>+</sup> del xilema y, probablemente de forma indirecta, contribuye a la compartimentación vacuolar de Na<sup>+</sup> en la raíz, habiéndose especulado en el pasado su implicación en la recirculación del Na<sup>+</sup> hasta la raíz a través del floema (Rus *et al.*, 2001; Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007). Estudios en tomate proponen un modelo en el que los ortólogos de estos dos transportadores se coordinan para

evitar la acumulación de  $\text{Na}^+$  en los tejidos más vulnerables. El  $\text{Na}^+$  que entra en la raíz es cargado en el xilema por SISOS1 y descargado para su acumulación en el tallo por el ortólogo de HKT1;1. A su vez, este último lo descarga en las hojas maduras con un sistema vacuolar desarrollado para su compartimentación, mientras que SISOS1 lo excluye del citosol de hojas jóvenes, favoreciendo su deposición en el apoplasto. (Olías *et al.*, 2009)(ver apartado I.7.3).

### **Glándulas salinas.**

Algunas halofitas han desarrollado estas estructuras para adaptarse a medios salinos. Se encargan de expulsar el exceso de sales mediante su bombeo activo a través de la epidermis de las hojas, donde la cutícula cerosa las mantiene separadas de las células del mesófilo. La acumulación de sales en la epidermis tiene como resultado una drástica reducción del potencial osmótico, lo que causa un flujo de agua a través de las glándulas. Por este motivo, esta estrategia sólo es válida para plantas pertenecientes a hábitats sin restricción en la disponibilidad de agua, como los marjales salinos (Tester y Davenport, 2003). Algunas gramíneas pertenecientes a la subfamilia de las cloridoideas, así como la especie silvestre emparentada con el arroz *Porteresia coarctata*, presentan pequeñas glándulas bicelulares que segregan sales para incrementar su halotolerancia (Amarashinge y Watson, 1989; Flowers *et al.*, 1990; McWorther *et al.*, 1995; Marcum, 1999). Las halofitas de hábitats muy secos presentan un tipo especial de glándulas llamadas “tricomas salinos”. Están compuestos por dos células en la superficie de la hoja, de las cuales la célula exterior acumula sales y agua hasta que estalla y libera el  $\text{Na}^+$  sin producir pérdidas de agua tan elevadas como en el caso de las glándulas salinas. (Tester y Davenport, 2003).

### **Inhibición del crecimiento de la planta.**

El estrés salino, como muchos otros tipos de estrés abiótico, produce una inhibición del crecimiento que se aprovecha para ahorrar recursos energéticos que las plantas pueden utilizar para su supervivencia en condiciones adversas (Zhu, 2001a). El exceso de  $\text{Na}^+$  induce el cierre estomático por represión de canales rectificadores de entrada de  $\text{K}^+$  en células guarda (Véry *et al.*, 1998). De este modo se evita la acumulación por evapotranspiración de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea de la planta, siendo la incapacidad para cerrar los estomas una causa importante de la sensibilidad de algunas especies a la salinidad (Robinson *et al.*, 1997). El cierre estomático conlleva una menor toma de  $\text{CO}_2$ , lo que repercute negativamente en el crecimiento de la planta al disminuir la eficiencia fotosintética (Hasegawa *et al.*, 2000).

Las CDKs (del inglés, *Cyclin Dependent Kinases*) son serina/treonina kinasas implicadas en el desarrollo secuencial del ciclo celular, para lo que requieren la unión a reguladores positivos conocidos como ciclinas (Evans *et al.*, 1983; Francis, 2007). En *Arabidopsis* existen 7 clases de CDKs, denominadas con las letras A a F, y la clase de proteínas similares a las CDKs, CDKLs (Menges *et al.*, 2005) La reducción de la actividad de las CDKs tiene como consecuencia la detención del ciclo celular en las interfases G1/S o G2/M y por lo tanto la inhibición de la elongación y división celular (Schuppler *et al.*, 1998; Kitsios y

Doonan, 2011). El estrés hídrico disminuye la expansión o división celular en hojas de guisante según su estado de desarrollo, mientras que favorece la formación de células grandes en las raíces de maíz como consecuencia de retrasos en la mitosis (Lecoeur *et al.*, 1995; Sacks *et al.*, 1997). En células del mesófilo de trigo sometido a sequía se vio que la menor división celular correlacionaba con la inhibición de la actividad de CDKA1, ocasionada por modificaciones posttraduccionales y alteraciones del nivel de expresión de ciclinas (Schuppler *et al.*, 1998; Granier *et al.*, 2000). En *Arabidopsis*, el estrés salino disminuye el nivel de transcrito de CDKs de las clases A y B, produciéndose menos células y de menor tamaño en parte aérea y ápice radical como consecuencia de la inhibición transitoria de la mitosis (Bursens *et al.*, 2000; West *et al.*, 2004). El ABA acumulado ante estrés hídrico y salino induce la expresión del inhibidor de CDKs ICK1, que detiene la división celular, aunque permite la endorreplicación del DNA (Wang *et al.*, 1998; Weini *et al.*, 2005). La sobreexpresión de este inhibidor produce plantas transgénicas más pequeñas y con alteraciones morfológicas (Wang *et al.*, 2000). La expresión de ICK1 en plantas de *Brassica napus* produjo alteraciones en la morfología de los pétalos, así como en la fertilidad del polen (Zhou *et al.*, 2001). En el mutante de *Arabidopsis sto1*, identificado por su mayor tolerancia estrés salino y osmótico, la acumulación de ICK1 debida a NaCl es menor (Ruggiero *et al.*, 2004). Mediante la fusión de ICK1 y mutantes por delección a GFP se identificaron 3 dominios funcionales responsables de su unión a CDKs (en el extremo carboxiterminal), localización nuclear (dominio central) e inhibición de su actividad por aumentar su inestabilidad *in vivo* (en el extremo aminoterminal) (Zhou *et al.*, 2003).

Las proteínas DELLA son una subfamilia de proteínas nucleares, perteneciente a la familia específicas de plantas GRAS, que reciben su nombre por la presencia del motivo conservado DELLA cerca del extremo aminoterminal (Peng *et al.*, 1997; Pysh *et al.*, 1999). El genoma de *Arabidopsis* codifica 5 genes de proteínas DELLA (*RGA*, *GAI*, *RGL1*, *RGL2* y *RGL3*), encargadas de reprimir las respuestas a giberelinas en presencia de estrés (Tyler *et al.*, 2004). *RGA1* fue la primera en identificarse por la capacidad del mutante nulo *rga1* de suprimir parcialmente el fenotipo enano y con retraso en la floración del mutante para la síntesis de giberelinas *ga1-3* (Silverstone *et al.*, 1997). El doble mutante *rga1 gai* suprimió totalmente este fenotipo, demostrando que *RGA1* y *GAI* son los dos represores primarios que modulan este fenómeno de la respuesta a giberelinas, mientras que estudios posteriores con el mutante *rgl2* implicaban a esta proteína en la germinación de las semillas en presencia de luz (Dill y Sun, 2001; Lee *et al.*, 2002). Las proteínas DELLA estabilizadas reprimen la señalización por giberelinas, reprimiendo el crecimiento de la planta en situaciones de estrés. El receptor de giberelinas *GID1* (del inglés, *Gibberellin-Insensitive Dwarf 1*) se une en presencia de esta hormona a las proteínas DELLA para que sean degradadas por poliubiquitinación, proceso en el que también participa el regulador positivo de la respuesta a giberelinas *SLEEPY1*. Los motivos DELLA y VHYNP en su extremo aminoterminal son necesarios para la interacción con *GID1*, mientras el motivo GRAS en el carboxiterminal lo es para la interacción con *SLEEPY1*. La fosforilación de las proteínas DELLA en una región rica en serina y treonina situada en su extremo aminoterminal impide la interacción con *SLEEPY1*, favoreciendo su integridad. (Tyler

*et al.*, 2004; Sun y Gubler, 2004; Hussain *et al.*, 2005; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2006). Un mutante de pérdida de función para 4 de las 5 proteínas DELLA (*gai rga rgl1 rgl2*) mostró menor sensibilidad al retraso en el desarrollo producido por concentraciones subletales de Na<sup>+</sup> y mayor contenido en giberelinas bioactivas. A su vez, la respuesta a ABA y etileno fue menor, demostrando el papel de estas proteínas en la integración de respuestas de crecimiento a distintas señales ambientales (Achard *et al.*, 2006). Un microarray para la detección de dianas de las proteínas DELLA llevó a la identificación de 14 genes, todos ellos inducidos por estas proteínas y reprimidos por giberelinas. Entre ellos se encontraron distintos genes de biosíntesis de giberelinas, un receptor de esta hormona, reguladores negativos de la ruta de señalización por esta hormona y *XERICO*, responsable de la acumulación de la hormona con funciones antagonistas a las giberelinas ABA. (Zentella *et al.*, 2007). Las proteínas DELLA también facilitan la aclimatación de las plantas al frío y mejoran su tolerancia a estrés oxidativo. El factor de transcripción inducible por frío CBF1, mediante la activación de la GA2 oxidasa, provoca la degradación de giberelinas, lo que a su vez favorece la estabilización de las DELLA. Mediante la inducción de genes de detoxificación de ROS, estas proteínas protegen a la célula de la muerte celular por daño oxidativo (Achard *et al.*, 2008a, 2008b).



**Figura I.1. Esquema de los efectos del estrés y las respuestas adaptativas de las plantas.** Las condiciones de salinidad y sequía causan a las plantas en primer lugar estrés iónico y osmótico. De éstos se derivan varios efectos secundarios (estrés oxidativo, deficiencia en la toma de nutrientes, desregulación de la fotosíntesis, detención del crecimiento celular, cierre estomático y muerte celular programada). Las plantas desarrollan respuestas adaptativas como el mantenimiento de la homeostasis iónica y osmótica, la detoxificación de las ROS y la inhibición del crecimiento, que tienen como última consecuencia el incremento de su tolerancia a estrés.

#### **I.4. Transducción de señales en respuesta a estrés salino.**

El reconocimiento del estrés salino por sensores, mayoritariamente no identificados, genera mensajeros secundarios que, mediante la activación de cascadas de fosforilación de proteínas, activan finalmente a proteínas implicadas directamente en la protección celular o factores de transcripción que controlan la transcripción de genes regulados por estrés (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2002; Xiong *et al.*, 2002). Las rutas de señalización son muy complejas y a menudo comparten entre sí elementos comunes, siendo necesaria la adecuada coordinación de los distintos elementos para la producción de respuestas específicas inducibles para cada tipo de estrés (Knight y Knight, 2001; Zhu, 2002).

##### **Sensores del estrés salino.**

En *Escherichia coli*, los cambios en la turgencia celular debidos a estrés hipo e hiperosmótico causan estimulación mecánica que activan o reprimen respectivamente a canales mecanosensibles para la liberación de agua y solutos (Booth y Louis, 2000; Blount y Moe, 1999). En levadura, la detección del estrés osmótico mediante los sensores transmembrana SLN1 y SHO1 activa sendas cascadas de señalización que convergen en la fosforilación de la MAPKK Pbs2, que a su vez fosforila y activa a la MAPK HOG1. HOG1 inhibe por fosforilación a SKO1, represor transcripcional de la Na<sup>+</sup>-ATPasa ENA1, favoreciendo así el bombeo activo de Na<sup>+</sup> al medio extracelular (Maeda *et al.*, 1995; Proft y Serrano, 1999; revisado por Saito y Tatebayashi, 2004). La histidín-kinasa de Arabidopsis ATHK1 (Urao *et al.*, 1999) es un candidato a osmosensor en plantas. ATHK1 se induce por estrés salino y baja temperatura y es capaz de activar la cascada de HOG1 en el mutante de levadura con sus dos osmosensores, SLN1 y SHO1, mutados. Estudios transcripcionales en tabaco han identificado un posible receptor de estrés osmótico, NtC7, también inducido por heridas (Tamura *et al.*, 2003). En cambio, poco se sabe de la detección específica del estrés iónico. El Na<sup>+</sup> podría ser detectado por receptores en la membrana plasmática o en el citosol. Dada la presencia de una larga cola citosólica en el extremo carboxiterminal de SOS1, se postuló su función como sensor de Na<sup>+</sup> (Shi *et al.*, 2000; Zhu, 2002), si bien esta hipótesis continúa de momento sin confirmarse.

##### **Mensajeros secundarios.**

La detección de todo tipo de estreses por los sensores induce oscilaciones transitorias en los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólicos (Sanders *et al.*, 1999). El tipo de señal de Ca<sup>2+</sup> varía en función del tipo de estrés, el grado de desarrollo del mismo, el tipo de tejido y la exposición previa a dicho estrés (Knight *et al.*, 1997; Plieth *et al.*, 1999; Kiegle *et al.*, 2000). El incremento primario en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico facilita la generación de moléculas señalizadoras secundarias que pueden estimular nuevos incrementos transitorios de Ca<sup>2+</sup> para



la regulación de pasos previos o la señalización primaria de nuevas rutas (Xiong *et al.*, 2002). La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en las células se mantiene en  $\sim 200$  nM en condiciones fisiológicas, si bien en el citosol existe una cantidad de este catión mucho mayor que se encuentra unida a distintas proteínas (Bush, 1995). Los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden aumentar, en respuesta a cualquier estímulo, debido a su entrada pasiva por canales de la membrana plasmática o por su liberación de orgánulos con capacidad de secuestrar este catión como el retículo endoplasmático, las mitocondrias, los cloroplastos y sobre todo la vacuola (Sanders *et al.*, 1999). En la membrana plasmática existen dos tipos de canales para permitir la entrada pasiva de  $\text{Ca}^{2+}$ : los canales no selectivos “maxi-catión” y los canales selectivos dependientes de voltaje (Piñeros y Tester, 1997; White, 2000), muchos de los cuales se activan por despolarización de la membrana plasmática (Ward *et al.*, 1995). En el retículo endoplasmático, a su vez, existen canales que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol durante la señalización y son activados por inositol trifosfato, ADP-ribosa cíclica o cambios en el potencial de membrana (Schumaker y Sze, 1987; Johannes *et al.*, 1992; Gelli y Blumwald, 1993; Allen y Sanders, 1994; Allen *et al.*, 1996)

Estos incrementos en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  son transitorios y rápidamente se ponen en funcionamiento los mecanismos para reestablecer su homeostasis en el citosol: bombas y transportadores. Las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  son ATPasas de tipo P que utilizan la hidrólisis del ATP para bombear  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de gradiente. Existen dos familias distintas de estas proteínas (Axelsen y Palmgren, 1998): la familia IIA incluye ATPasas similares a las bombas del retículo endoplasmático de animales, como LCA1 de tomate, OCA1 de arroz o ECA1/ACA3 de *Arabidopsis* (Wimmers *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 1997). La familia IIB incluye ATPasas similares a las bombas de membrana plasmática animales estimuladas por calmodulina, como ACA1 y ACA2 de *Arabidopsis* o BCA1 de *Brassica oleracea* (Huang *et al.*, 1993; Malmstrom *et al.*, 1997; Harper *et al.*, 1998). Los transportadores CAX son antiportadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  vacuolares que utilizan la fuerza protón-motriz generada por la  $\text{H}^+$ -ATPasa para transportar  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de gradiente (Sanders *et al.*, 1999). En el genoma de *Arabidopsis* existen 12 posibles transportadores CAX (CAX1-11 y MHX), habiéndose aislado algunos de ellos por su capacidad para suprimir el fenotipo de hipersensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de un mutante de levadura *pmc1 vcx1 cnb1*, carente de los sistemas endógenos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e incapaz de compartimentar este catión en la vacuola (Hirschi *et al.*, 1996; Mässer *et al.*, 2001). La kinasa SOS2 es capaz de activar a CAX1 en esta cepa, suprimiendo su fenotipo de hipersensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ . Plantas transgénicas del mutante *cax1* de *Arabidopsis* sobreexpresando CAX1 mostraron cierta halosensibilidad, sugiriendo un incremento descontrolado de la compartimentación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en la vacuola debida a la desregulación de CAX1. De este modo la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por estrés disminuiría, impidiendo desencadenar respuestas de adaptación como la ruta SOS de halotolerancia, descrita en el apartado I.7.3.2 de la presente Tesis, por la que se activa el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1 (Cheng *et al.*, 2003).

Los fosfolípidos de la membrana plasmática constituyen un sistema dinámico que genera multitud de moléculas señalizadoras mediante su hidrólisis con las fosfolipasas A2, C y

D (Zhu, 2002; Xiong *et al.*, 2002). La fosfolipasa C activada (PI-PLC) hidroliza el 4,5-difosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>) (Martin, 1998). La producción de PIP<sub>2</sub> se induce en plantas ante estrés osmótico y ABA a través de la inducción de la quinasa PIK5, mientras que la sequía y el estrés salino aumentan la expresión de PI-PLC (Hirayama *et al.*, 1995; Mikami *et al.*, 1998). La hidrólisis de PIP<sub>2</sub> por PI-PLC produce dos moléculas de gran importancia en señalización celular: diacilglicerol (DAG) y 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>). A diferencia de lo observado en animales, en plantas no es el IP<sub>3</sub> sino el IP<sub>6</sub> el que libera Ca<sup>2+</sup> de orgánulos de almacenamiento interno, provocando el cierre estomático y la activación de genes de respuesta a estrés. Por otra parte, se desconoce la existencia de análogos de la proteína-quinasa C animal en plantas y el principal mensajero secundario es el ácido fosfatídico (PA) producido por la fosforilación de DAG mediante diacilglicerol kinasas (DGKs) (revisado en Munnik y Vermeer, 2010). El PA se induce rápidamente en presencia de estrés salino en todo tipo de especies vegetales (Bargmann *et al.*, 2009). La inducción de PA también se da por estrés osmótico, si bien de una forma más lenta y menos severa. Se cree que dos proteínas pertenecientes a la familia SnRK2 (del inglés, *SNIF-Related Kinases 2*) son activadas por este fosfolípido en respuesta a estrés osmótico, ya que se inducen por este tipo de estrés y muestran capacidad de unión a PA (Testerink *et al.*, 2004). La aplicación de un choque frío a 0°C produjo en Arabidopsis, una inducción temprana de *AtDGK1* y una más tardía de *AtDGK2*. Al parecer ambos se inducen por el factor de transcripción ICE1, regulador positivo de muchos genes inducibles por frío. (Chinnusamy *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; ). Se han identificado varias proteínas capaces de unirse a PA en plantas (revisado en Arisz *et al.*, 2009), destacando las kinasas CTR1 y PDK1, y la fosfatasa ABI1. El PA inhibe a CTR1 y ABI1, reguladores negativos de la señalización por etileno y ABA respectivamente, mientras activa a PDK1, que a su vez activa a la quinasa OX11 para regular positivamente la respuesta a ROS (Anthony *et al.*, 2004; Rentel *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004) La inhibición de la PI-PLC impide la acumulación de PA en presencia de estrés salino y con ello la inducción de genes de respuesta a estrés como *RD29A* y *COR47* (Takahashi *et al.*, 2001; DeWald *et al.*, 2001). Dada la importancia de estos compuestos en procesos de señalización, su producción y degradación deben estar perfectamente reguladas. El inositol se degrada por rutas de inositol polifosfato 3-quinasa o inositol polifosfato 5-fosfatasa, produciéndose respectivamente 1,3,4,5-tetrafosfato o 1,4-difosfato de inositol, ambos incapaces de activar cascadas de respuesta (Majerus, 1992). En Arabidopsis se ha identificado la proteína FRY1/SAL1, capaz de contribuir al reciclaje de fosfatos de inositol mediante la hidrólisis de 1,4-difosfato y 1,3,4-trifosfato de inositol (Quintero *et al.*, 1996).

Las plantas producen ROS continuamente a través de procesos como la fotosíntesis en los cloroplastos, la respiración celular en las mitocondrias o la detoxificación en los peroxisomas, pero las degradan con enzimas y antioxidantes para mantenerlos a bajos niveles (revisado en Jaspers y Kangasjärvi, 2011). El estrés salino, al igual que el frío y el estrés hídrico, induce la acumulación de ROS por incremento de su producción e inhibición de su degradación (Hasegawa *et al.*, 2000). Aunque el exceso de ROS produce daño oxidativo en distintas estructuras celulares, su papel en señalización controla procesos como la respuesta a

patógenos, respuesta a estrés abiótico y muerte celular programada (Knight y Knight, 2001). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducido por ABA activa los canales de Ca<sup>2+</sup> en las células guarda para producir el cierre estomático (Pei *et al.*, 2000), induce la expresión de la catalasa *CAT1* (Guan *et al.*, 2000) o de genes de respuesta a estrés térmico (Gong *et al.*, 1998) e incluso favorece la biosíntesis de ABA (Zhao *et al.*, 2001). En *Arabidopsis*, las ROS activan a la MAPKKK ANP1, lo que induce la expresión de genes de respuesta como *GST6*, *HSP18.2* y *GH3* (Kovtun *et al.*, 2000). El ácido salicílico potencia la generación de ROS en la respuesta hipersensible a patógenos y, presumiblemente, también ante estrés osmótico y salino, como sugiere la mayor tolerancia a este tipo de estrés de plantas de *Arabidopsis* expresando una salicilato hidroxilasa que estaría evitando la acumulación de ROS debida a ácido salicílico (Borsani *et al.*, 2001). Genes de respuesta a estrés osmótico como el factor de transcripción *DREB2A*, varios factores pertenecientes a las familias AP2/ERF, NAM/NAC y WRKY y las MAP kinasas *AtMEKK1*, *AtMPK4* y *AtMPK6* también se inducen por la presencia de ROS (Desikan *et al.*, 2001; Yuasa *et al.*, 2001; Teige *et al.*, 2004; Gadjev *et al.*, 2006).

El ácido abscísico (ABA) se acumula en las plantas ante estrés osmótico debido a la activación mediante factores de transcripción de genes de su ruta de biosíntesis (*ABA1*, *NCED*, y *ABA3/LOS5*) y, probablemente, a la inhibición de los que controlan su degradación a ácido faseico (Koornneef *et al.*, 1989; Liotenberg *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2000; Zhu, 2002). El gen *NCED* constituye un paso limitante en la biosíntesis de ABA, ya que es el único que no se induce por esta hormona (Iuchi *et al.*, 2001). Las SnRK2 actúan como reguladores positivos en la ruta de señalización por esta hormona, como demuestran los fenotipos de insensibilidad a ABA en inhibición de la germinación y elongación de la raíz mostrados por el doble mutante *snrk2.2 snrk2.3*. (Fujii *et al.*, 2007). El genoma de *Arabidopsis* codifica 10 SnRK2s, de las cuales 3 (*OST1*, *SnRK2.2* y *SnRK2.3*) participan en la señalización por ABA (Fujii y Zhu, 2009; Fujita *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2009). Las SnRK2 activadas por fosforilación muestran actividad kinasa y son capaces de fosforilar a numerosas proteínas implicadas en la respuesta a ABA (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000; Belin *et al.*, 2006), mientras las fosfatasas PP2C de tipo A como *ABI1* y *2* o *HAB1*, al inhibir a las anteriores en ausencia de ABA por desfosforilación, funcionan como reguladores negativos de la respuesta a esta hormona (Schweighofer *et al.*, 2004; Umezawa *et al.*, 2009). La familia *PYR/PYL/RCAR* se ha identificado por su papel como receptores de ABA (Park *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2009). Estas pequeñas proteínas solubles, tras unirse a ABA, cambian su conformación para facilitar la unión a fosfatasas de tipo PP2C, compitiendo con ellas por la unión a las SnRK2 (Melcher *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009; Miyazono *et al.*, 2009). En el cuádruple mutante *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4*, el ABA fue incapaz de activar a las kinasas SnRK2 (Park *et al.*, 2009).

Tras numerosos estudios de inducción de genes de respuesta a estrés en mutantes de *Arabidopsis* deficientes (*aba1-1*) o insensibles a ABA (*abi1-1* y *abi2-1*), se observó que la activación de genes de respuesta a estrés osmótico se puede llevar a cabo por rutas dependientes o independientes de ABA (Thomashow, 1998; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki,

2000). Dos de los principales loci identificados por su baja respuesta a estrés abiótico, *LOS5* y *LOS6*, mostraron ser deficientes en la inducción de ABA por sequía y osmolaridad respectivamente (Xiong et al., 2001). El mutante *los5*, alelo de *ABA3*, mostró baja expresión de los genes *RD29A*, *COR15*, *COR47*, *RD22* y *P5CS*, mientras en el mutante *los6*, alelo de *ABA1*, se vio una menor inducción de *RD29A*, *COR15A*, *KIN1*, *COR47*, *RD19* y *ADH*, revirtiéndose en ambos casos el fenotipo mediante la aplicación exógena de ABA. En los promotores de los genes que se inducen en respuesta a estrés hídrico y osmótico ante ABA se han identificado secuencias llamadas ABRE (del inglés, *Abscisic Acid Responsive Elements*), a las que se unen varios factores de transcripción del tipo cremallera de leucina básica (bZIP) llamados ABF/AREB (Stockinger et al., 1997; Choi et al., 2000; Uno et al., 2000). El genoma de *Arabidopsis* codifica 9 factores de transcripción de este tipo. Los genes *AREB1*, *AREB2* y *AREB3*, funcionalmente redundantes, se inducen en tejidos vegetativos por ABA, salinidad y sequía. Para su activación durante la señalización por ABA, estos factores de transcripción necesitan ser fosforilados por kinasas SnRK2 (Fujita et al., 2005, 2009; Yoshida et al., 2010).

Por su parte, los promotores de los genes no inducibles por ABA contienen secuencias DRE/CRT (del inglés, *Dehydration Responsive Elements*), que son reconocidas por factores de transcripción como los de tipo CBF/DREB1, o CBF/DREB2 (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Stockinger et al., 1997; Gilmour et al., 1998; Liu et al., 1998; Medina et al., 1999). Los factores de tipo CBF/DREB1 constituyen un destacado regulón que activa más de 40 genes de respuesta a frío. Se activa por el factor de transcripción inducible por frío ICE1 y se reprime por MYB15, que se unen al promotor CBF3 para regular la respuesta de las plantas a este tipo de estrés. A través del promotor CBF2, también es posible activar su transcripción mediante activadores de unión a calmodulina (Chinnusamy et al., 2003; Agarwal et al., 2006; Doherty et al., 2009; revisado por Qin et al., 2011). Además, algunos de estos factores de transcripción se activan también por estrés osmótico (Haake et al., 2002; Magome et al., 2004). Dos factores pertenecientes a este grupo, RAP2.4 y RAP2.4B, se identificaron recientemente como reguladores de genes de acuaporinas, indicando su papel en el mantenimiento de la homeostasis hídrica en condiciones de estrés (Rae et al., 2011). Los de tipo CBF/DREB2 no se inducen por frío sino por salinidad y estrés hídrico, incrementando la expresión de genes de respuesta a ambos tipos de estrés, así como de factores de transcripción inducibles por estrés térmico (Sakuma et al., 2002, 2006a, 2006b). Las plantas con sobreexpresión de factores DREB1 muestran un perfil transcriptómico y metabólico similar al de plantas sometidas a estrés por congelación, mientras que la sobreexpresión de factores de tipo DREB2 favorece la acumulación de metabolitos propios de plantas deshidratadas (Maruyama et al., 2009).

Los nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP son mensajeros secundarios que regulan la apertura estomática, flujo de cationes mono y divalentes, desarrollo de cloroplastos, señalización por giberelinas para la hidrólisis de almidón en las láminas de aleurona, respuesta a patógenos y transcripción de muchos genes, entre los que se encuentran transportadores (Bowler et al., 1994; Penson et al., 1996; Volotovski et al., 1998; Maathuis y Sanders, 2001; Newton et al., 2004; Maathuis, 2006; Martínez-Atienza et al., 2007b). En plantas, los

nucleótidos cíclicos tienen como principal diana a los canales dependientes de nucleótidos cíclicos, a los que activan (CNGC, del inglés *Cyclic Nucleotide Gated Channels*). Se cree que estos canales pueden convertir la señal de nucleótidos cíclicos en una señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin necesidad de kinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, que sí son necesarias en células animales (Bailey *et al.*, 2005).

### **Rutas de señalización mediante cascadas de fosfoproteínas.**

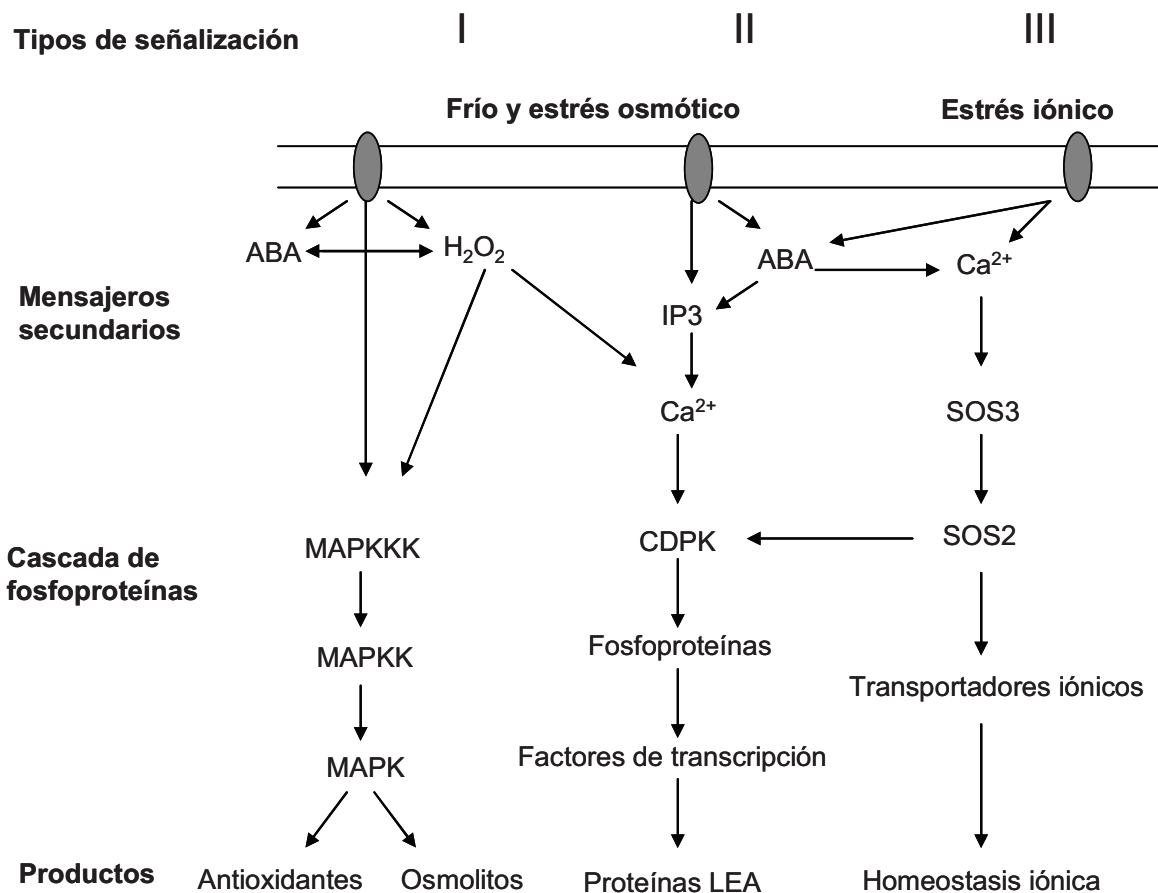
En plantas la señalización del estrés abiótico desencadena rutas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (a través de CDPKs y CBLs) y cascadas de MAP kinasas, que no están reguladas por este catión (Xiong *et al.*, 2002).

Las CDPKs (del inglés *Calcium-Dependent Protein Kinases*) son serina/treonina kinasas con un dominio carboxiterminal similar a la calmodulina que contiene 4 motivos “EF-hand” para la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ . Algunas contienen la secuencia de miristoilación en su extremo aminoterminal, sugiriendo una posible asociación a membranas plasmáticas (Xiong *et al.*, 2002). Las primeras demostraciones de la implicación de las CDPKs en la transducción de señales por estrés se obtuvieron en protoplastos de maíz, utilizando el gen de la luciferasa. Cuando se expresó bajo el control del promotor del gen *HVA1* de respuesta a ABA de cebada o del gen *RAB16* de respuesta a ABA y estrés osmótico en arroz, fue inducido por la kinasa de Arabidopsis AtCDPK1, que está implicada en señalización por estrés salino e hídrico (Sheen, 1996; Saijo *et al.*, 2000). En arroz, *OsCDPK7* se induce por frío y estrés salino, y promueve la expresión de genes diana por salinidad y sequía, aunque no por frío (Saijo *et al.*, 2000). En *Mesembryanthemum crystallinum*, McCDPK1 es una CDPK inducida por salinidad y sequía que fosforila al regulador de pseudo-respuesta CSP1 en presencia de señales de  $\text{Ca}^{2+}$ . El estrés salino favorece la colocalización de ambas proteínas en el núcleo para facilitar su interacción (Patharkar y Cushman, 2000). El genoma de Arabidopsis codifica 34 CDPKs distintas (Harmon *et al.*, 2000), que han ido caracterizándose en los últimos años. CPK32 activa por fosforilación al factor de transcripción ABF4 y su sobreexpresión produjo plantas de Arabidopsis hipersensibles a ABA y salinidad, indicando su papel en la señalización por esta hormona (Choi *et al.*, 2005). Los fenotipos obtenidos mediante la sobreexpresión y pérdida de función de CPK23 en Arabidopsis también demostraron su papel en la señalización por ABA. Junto con CPK21, activa por fosforilación al canal de salida de aniones SLAC1 en presencia de esta hormona. De este modo, la despolarización de la membrana plasmática produce la activación del canal de salida de  $\text{K}^+$  GORK, ocasionando el cierre estomático en episodios de estrés hídrico (Ma y Wu, 2007; Geiger *et al.*, 2010). CPK3 y CPK6 también favorecen el cierre estomático por ABA, aunque se desconoce su mecanismo de acción (Mori *et al.*, 2006). También CPK4 y CPK11 son reguladores positivos de la respuesta a ABA, al parecer mediante la activación de los factores ABF1 y ABF4, mientras que CPK12 equilibra la respuesta a esta hormona mediante la activación por fosforilación tanto de estos dos factores de transcripción como del regulador negativo ABI2 (Zhu *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2011). Finalmente, CPK10

regula positivamente la respuesta de las plantas a sequía mediante la activación de la proteína HSP1 (Zou *et al.*, 2010).

Las CBLs (del inglés *Calcineurin B-Like protein*) muestran similitud con la subunidad reguladora B de la calcineurina y con los sensores neuronales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Liu y Zhu, 1998; Kudla *et al.*, 1999). Estas proteínas se caracterizan por la presencia de 4 módulos formados por un dominio hélice-bucle-hélice de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  llamado “EF-hand” (Guo *et al.*, 2001; Luan *et al.*, 2002). En el genoma de *Arabidopsis* existen 10 proteínas CBL distintas, que actúan como sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  para la activación de 25 kinasas con las que interactúan (llamadas CIPKs, del inglés *CBL-Interacting Protein Kinases*) (Guo *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2002; Hrabak *et al.*, 2003). En condiciones normales, las CIPKs se encuentran autoinhibidas mediante la interacción del dominio aminoterminal catalítico con el carboxiterminal regulador. Las CBLs activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  se unen al dominio FISL de las CIPKs, situado entre los dominios catalítico y regulador, liberando a la kinasa de su autoinhibición y permitiéndole activar a proteínas diana por fosforilación (Albrecht *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001). La expresión constitutiva de *CIPK20*, así como el silenciamiento de *CBL1* o *CIPK15*, que codifica a la kinasa con la que interactúa, produjeron plantas transgénicas hipersensibles a ABA en las que se indujo la expresión de numerosos genes de respuesta a esta hormona (Leung y Giraudat, 1998, Gong *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2002). Estos resultados indican que el complejo CBL1/CIPK15 actúa como regulador negativo de la respuesta global a ABA, mientras CIPK20 sería un regulador positivo. También CIPK3 regula la señalización por ABA, ya que mutantes por inserción de T-DNA en este gen mostraron hipersensibilidad durante germinación y desarrollo de plántulas (Kim *et al.*, 2003). CBL2, en interacción con CIPK11, controla el pH citosólico inhibiendo la  $\text{H}^+$ -ATPasa mediante la prevención de su activación por la proteína 14-3-3 (Fuglsang *et al.*, 2007). En respuesta a bajas concentraciones de  $\text{K}^+$  en el medio, tanto CBL1 como CBL9 reconocen las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas y activan a CIPK23, que fosforila a AKT1 para permitir la toma de  $\text{K}^+$  de alta afinidad (Li *et al.*, 2006). Adicionalmente, ambas CBLs regulan, a través de CIPK23, el movimiento estomático, mostrando el doble mutante *cb11 cb19* (pero no ninguno de los dos mutantes simples) hipersensibilidad a ABA en el cierre de los estomas (Cheong *et al.*, 2007). También se unen a CIPK1 para activar respuestas desencadenadas por estrés osmótico (en el caso de CBL1) o por ABA (en el caso de CBL9), habiéndose detectado simultáneamente la formación de ambos complejos en la membrana plasmática (D’Angelo *et al.*, 2006; Waadt *et al.*, 2008). La interacción entre CBL1 y CIPK1 se da en el citoplasma, donde CBL1 es miristoilada en su extremo aminoterminal para dirigir el complejo al retículo endoplasmático. Allí es modificada por una palmitoil-transferasa, que produce su S-palmitoilación para permitir el transporte del complejo a la membrana plasmática (Batistic *et al.*, 2008). Finalmente, en la ruta SOS, la CBL SOS3 (CBL4) responde a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  producida por el estrés salino liberando a la CIPK SOS2 (CIPK24) de su autoinhibición para permitir la activación por fosforilación del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1 (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2011)(ver apartado I.7.3.2).

El estrés salino puede desencadenar respuestas independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de cascadas de MAP kinasas (del inglés, *Mitogen Activated Protein-Kinases*). Las señales percibidas por las ~60 MAPKKKs codificadas en el genoma de *Arabidopsis* son transducidas por las ~10 MAPKKs a las ~20 MAPKs, que están implicadas en señalización por estreses biótico y abiótico, así como por hormonas y cambios durante el desarrollo (Ligterink y Hirt, 2001). La primera cascada de MAP kinasas identificada en *Arabidopsis* fue la formada por AtMEKK1, AtMEK1/AtMKK2 y AtMPK4/AtMPK6 (Ichimura *et al.*, 2000). El estrés salino induce la expresión y actividad de AtMEKK1. En el mutante de *Arabidopsis mpk4*, se observó insensibilidad a ácido jasmónico, hiperacumulación de ácido salicílico y respuesta sistémica adquirida (SAR) constitutiva. La fosfatasa MKP1 puede interactuar con AtMPK4 y AtMPK6 (Ulm *et al.*, 2002), regulando negativamente la transcripción del antiportador catión/ $\text{H}^+$  CHX17. Las ROS activan la cascada de MAP kinasas formada por ANP1, AtMPK3 y AtMPK6 (Kovtun *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003). La sobreexpresión de la MAPKKK ANP1 produjo plantas transgénicas de *Arabidopsis* con mayor inducción de genes de respuesta a estrés oxidativo y mayor tolerancia a congelación, salinidad y estrés térmico. La cascada formada por AtMKK1 y AtMPK6 regula el metabolismo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de CAT1, mientras AtMEKK1 y AtMPK4 lo regulan a través de CAT2 (Xing *et al.*, 2008; Pitzschke y Hirt, 2009). Los genes *AtMPK6* y *AtMPK3* se inducen por ozono, mostrando hipersensibilidad a esta ROS las líneas de *Arabidopsis* con pérdidas de función para estas proteínas (Ahlfors *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2005). La expresión de *AtMEKK1* y *AtMPK3* se induce también por sequía y elevada temperatura (Mizoguchi *et al.*, 1996), mientras que la de *AtMKK2*, así como *AtMPK4* y *AtMPK6* que funcionan como sustratos suyos, lo hacen por frío (Ichimura *et al.*, 2000; Mizoguchi *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2004). En tabaco, la sobreexpresión de la MAPKKK NtNPK1 produjo plantas transgénicas tolerantes a distintos estreses abióticos en las que la expresión constitutiva de la MAPKKK mimetizaba la señal generada por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , iniciando una cascada de fosforilación de MAP kinasas cuyo resultado era la activación de distintos genes de respuesta a estrés (Kovtun *et al.*, 2000). En maíz se han identificado más recientemente las MAP kinasas inducidas por salinidad ZmMPK3, ZmMAPK5 y ZmSIMK1. ZmMPK3 juega además un papel importante en respuesta a otros tipos de estrés abiótico como el estrés hídrico, mientras que ZmMAPK5 se induce por frío (Ding *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).



**Figura I.3. Principales tipos de señalización en las plantas durante estrés frío, hídrico y salino.** Se representan las moléculas señalizadoras, cascadas y productos de los tres tipos principales de rutas de señalización en plantas. El tipo I corresponde a las cascadas de MAP kinasas implicadas en la degradación de ROS y producción de osmolitos. El tipo II tiene como resultado la producción de proteínas de respuesta a estrés mediante rutas dependientes de Ca<sup>2+</sup>. El tipo III corresponde a la ruta SOS, específica de estrés iónico (Adaptado de Xiong *et al.*, 2002).

### I.5 El transporte iónico en el mantenimiento de la homeostasis y la tolerancia a estrés.

Los transportadores iónicos son indispensables para la planta, ya que permiten la toma y distribución intra e intercelular de elementos nutritivos, así como la expulsión de los que son perjudiciales. El genoma de *Arabidopsis* codifica ~800 proteínas de membrana, el 65% de las cuales funcionan como transportadores de iones y compuestos orgánicos (Saier, 2000). Las proteínas encargadas del transporte iónico se pueden clasificar en bombas, canales y transportadores (Sussman y Harper, 1989). Las bombas aprovechan directamente la energía obtenida mediante la hidrólisis de ATP o pirofosfato para el transporte de iones en contra de su gradiente electroquímico. A diferencia de las levaduras, las plantas vasculares no pueden expulsar Na<sup>+</sup> directamente a través de bombas ATPasa (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001). Sus bombas, H<sup>+</sup>-ATPasa de tipo P en membrana plasmática y H<sup>+</sup>-ATPasa de tipo V y H<sup>+</sup>-PPasa en tonoplasto, transportan H<sup>+</sup> en contra de gradiente para generar un potencial de



membrana que permita a los antiportadores catión/ $H^+$  el transporte activo de cationes (Blumwald *et al.*, 2000). Los canales realizan un transporte rápido y pasivo a través de membrana a una velocidad de  $10^7$  moléculas por segundo. Los transportadores pueden ser uniportadores, que transportan una molécula a favor de gradiente, o antiportadores y simportadores, que mueven simultáneamente dos moléculas, una a favor y otra en contra de gradiente, en dirección opuesta o en la misma dirección respectivamente. El transporte es más lento que en los canales, del orden de  $10^4$  moléculas por segundo (Niu *et al.*, 1995; Chrispeels *et al.*, 1999).

El análisis del genoma de *Arabidopsis* identificó cuatro subfamilias de transportadores catión/ $H^+$  con afinidad por  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Mg^{2+}$  (CaCA, NhaD, CPA1 y CPA2) (Mäser *et al.*, 2001). La subfamilia CaCA está formada por 11 transportadores  $Ca^{2+}/H^+$  llamados CAX1-11, en los que algunos miembros pueden transportar también  $Mn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  (Cheng *et al.*, 2002). AtMHX, relacionada filogenéticamente con la familia de los CAX, interviene en la compartimentación de  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en la vacuola (Shaul *et al.*, 1999). Los dos miembros de la subfamilia NhaD (NHD1 y NHD2) muestran cierta similitud con antiportadores  $Na^+/H^+$  bacterianos, habiéndose caracterizado solamente NHD1 como antiportador  $Na^+/H^+$  cloroplástico implicado en la toma de piruvato dependiente de  $Na^+$  llevada a cabo por el transportador BASS2 (Pardo *et al.*, 2006; Furumoto *et al.*, 2011). La familia CPA1 consta de 8 miembros: NHX1-6, SOS1 y NHX8. Son antiportadores catión/ $H^+$  vacuolares, un antiportador  $Na^+/H^+$  de membrana plasmática y un antiportador  $Li^+/H^+$  de membrana plasmática respectivamente (Blumwald, 2000; Qiu *et al.*, 2002, An *et al.*, 2007; Bassil *et al.*, 2011; Barragán *et al.*, 2012). Por último, la subfamilia CPA2 incluye 28 intercambiadores catión/ $H^+$  CHX y 5 antiportadores KEA (Pardo *et al.*, 2006).

Se ha demostrado la implicación de los transportadores HKT en el simporte de  $K^+$  y  $Na^+$  de alta afinidad o la toma de  $Na^+$  de baja afinidad en raíz, habiéndose propuesto también su papel en la toma de  $Na^+$  y su recirculación en plantas sometidas a estrés salino (Rubio *et al.*, 1995; Rus *et al.*, 2001; Laurie *et al.*, 2002; Apse y Blumwald, 2007). Los distintos transportadores HKT muestran selectividad iónica mezclada cuando se expresan en sistemas heterólogos. El análisis filogenético realizado mediante la comparación de secuencias de aminoácidos en distintos transportadores HKT de mono y dicotiledóneas llevó al establecimiento de 2 subfamilias (Platten *et al.*, 2006). Los miembros de la subfamilia 1 (HKT1;n) se encuentran representados tanto en mono como en dicotiledóneas y muestran especificidad por  $Na^+$ , posiblemente debido a la presencia de una serina en el primer bucle del poro. Los transportadores de la subfamilia 2 (HKT2;n) pertenecen exclusivamente a monocotiledóneas, transportan  $Na^+$  y  $K^+$ , y la serina típica de la subfamilia 1 se encuentra sustituida por una glicina (excepto en OsHKT2;1, que funciona como uniportador de  $Na^+$ ). Se ha sugerido que la principal función del único miembro de esta familia en *Arabidopsis*, AtHKT1;1, es el transporte a larga distancia de  $Na^+$ . En presencia de estrés salino, AtHKT1;1 descargaría  $Na^+$  del xilema y favorecería la acumulación preferente de este catión en raíz, protegiendo así al tejido foliar de los daños causados por su excesiva acumulación en la parte

aérea. Además, de forma indirecta, favorece la acumulación de  $K^+$  en parte aérea mediante la activación por despolarización celular de canales de salida de  $K^+$  (Rus *et al.*, 2004; Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007; revisado en Horie *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2010)(ver apartado I.7.3).

El exceso de  $Na^+$  interfiere con la toma de diversos iones (Binzel *et al.*, 1988), siendo el  $K^+$  el principal tanto por la importancia de sus funciones en la célula como por la similitud entre ambos cationes (Rains y Epstein, 1967; Marschner, 1995; Maathuis *et al.*, 1996; Blaha *et al.*, 2000; Forment *et al.*, 2002). La principal familia de transportadores de  $K^+$  en Arabidopsis es la KT/HAK/KUP, que se identificaron inicialmente en *E. coli* y se denominaron KT (del inglés K<sup>+</sup> Transporters), HAK (del inglés High Affinity K<sup>+</sup> Transporters) o KUP (del inglés, K<sup>+</sup> Uptake Permeases) según los diferentes grupos de investigación que los describieron originalmente. Existen 13 miembros de esta familia, implicados en el transporte de  $K^+$  de alta y baja afinidad y con localización en membrana plasmática y tonoplasto (Senn *et al.*, 2001; Véry y Sentenac, 2003). Se ha demostrado experimentalmente que 8 de estas proteínas (KUP1, KUP4, KUP5, KUP6, KUP7, KUP10, KUP11 y HAK5) pueden transportar  $K^+$  debido a su capacidad de complementar a mutantes de *E. coli* deficientes en la toma de este catión (Gierth *et al.*, 2005). De todas ellas, KUP1, KUP4 y HAK5 se han caracterizado también en planta, destacando la importancia de HAK5 para la toma de  $K^+$  en condiciones de déficit de este macronutriente (ver apartado I.6.1).

Existen 3 familias de canales permeables a  $K^+$  en Arabidopsis (ver apartado I.6): los canales rectificadores de tipo “*Shaker*”, los canales rectificadores de salida de  $K^+$  de dos poros y los canales de cationes no selectivos (NSCC, del inglés Non-Selective Cation Channels) (Shabala y Cuin, 2007). Los canales de tipo “*Shaker*” se encuentran en la membrana plasmática y permiten el paso de  $K^+$  dependiendo del voltaje (Véry y Sentenac, 2002). Esta familia incluye canales rectificadores de entrada de  $K^+$  activados por hiperpolarización como AKT1, KAT1, KAT2 y SPIK, canales rectificadores de salida de  $K^+$  activados por despolarización como SKOR y GORK, o canales débilmente rectificadores de entrada de  $K^+$  como AKT2 (Shabala y Cuin, 2007). Los canales de tipo “*Shaker*” controlan procesos como la toma de  $K^+$  de baja afinidad a través de la raíz, la carga de este catión en el xilema, su carga y descarga en el floema o la apertura y cierre estomático (Gaymard *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1998; Marten *et al.*, 1999; Lacombe *et al.*, 2000b; Szyroki *et al.*, 2001)(ver apartado I.6). Los canales de dos poros TPK se localizan principalmente en el tonoplasto y su capacidad de rectificación de salida de  $K^+$  es dependiente de  $Ca^{2+}$  (Schönknecht *et al.*, 2002). Los niveles del transcrito de KCO5/TPK5 descienden ante estrés salino, sugiriendo su papel en el mantenimiento de niveles de  $K^+$  en el citoplasma o el intercambio de  $K^+$  vacuolar por  $Na^+$  (Maathuis, 2006). Los canales no selectivos de cationes (NSCC, del inglés Non-Selective Cation Channels) se encuentran tanto en membrana plasmática como en tonoplasto, habiéndose identificado 40 posibles miembros de este grupo en el genoma de Arabidopsis (Mäser *et al.*, 2001; Shabala *et al.*, 2007). Muestran gran afinidad por cationes frente a aniones pero no discriminan entre  $Na^+$  y  $K^+$ , aceptándose su papel como principales causantes de la

entrada de  $\text{Na}^+$  en la planta, así como en la pérdida de  $\text{K}^+$  inducida por NaCl (Shabala *et al.*, 2006; Demidchik y Maathuis, 2007). Se incluyen en esta familia los canales dependientes de nucleótidos cíclicos (CNGC) y los receptores de glutamato (GLRs) (Leng *et al.*, 2002; Demidchik *et al.*, 2004)(ver apartado I.7.1.1).

## **I.6. Transporte de $\text{K}^+$ en la planta.**

El  $\text{K}^+$  es el soluto inorgánico más abundante en las células vegetales, llegando a constituir el 10% de su peso seco (Leigh y Wyn-Jones, 1984). Es un elemento esencial para las plantas con un papel central en procesos metabólicos como la fotosíntesis, biosíntesis de proteínas, osmorregulación, turgencia y mantenimiento del potencial de membrana (Schröder *et al.*, 1994; Véry y Sentenac, 2003; Gierth y Mäser, 2007). El contenido de este catión en el citoplasma está regulado con precisión para mantenerlo en una concentración de  $\sim 100$  mM. En cambio, el contenido vacuolar es muy variable y refleja el estado de la planta en cuanto a este elemento (Marschner *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1996). Las plantas presentan altos requerimientos de este catión, que tiene que ser eficientemente tomado de la solución del suelo a través de las raíces y transportado a la parte aérea. Adicionalmente, debe ser distribuido entre los distintos compartimentos celulares a concentraciones adecuadas (Gierth y Mäser, 2007).

### **I.6.1. Absorción de $\text{K}^+$ de alta y baja afinidad.**

Las células vegetales mantienen una concentración de  $\text{K}^+$  en el citosol en torno a 100 mM, desarrollando síntomas de deficiencia cuando ésta disminuye. La concentración de este catión en los suelos puede llegar a ser de sólo 10-100  $\mu\text{M}$ , por lo que las plantas necesitan un sistema de absorción de  $\text{K}^+$  bien desarrollado que permita su toma activa (Hedrich y Kudla, 2006).

La absorción de  $\text{K}^+$  a través de la raíz se describió en una primera aproximación como un proceso bifásico compuesto por dos mecanismos: el de clase I, también llamado de alta afinidad, que actúa cuando la concentración de  $\text{K}^+$  en el medio es de  $\sim 20$   $\mu\text{M}$  y el de clase II, o de baja afinidad, que toma  $\text{K}^+$  en el rango milimolar de concentraciones (Epstein *et al.*, 1963). Además, los transportadores de baja afinidad son constitutivos, mientras que los de alta afinidad son inducibles (Glass, 1976; Fernando *et al.*, 1990). La absorción de  $\text{K}^+$  en plantas se realiza principalmente a través de dos familias de transportadores: los canales rectificadores de entrada de  $\text{K}^+$  (KIRC, del inglés *K<sup>+</sup> Inward Rectifying Channels*) y los transportadores KT/HAK/KUP.

Los canales KIRC de tipo “*Shaker*” muestran activación dependiente de voltaje y se encargan de la toma pasiva de  $\text{K}^+$ . Son homo o heterotetrámeros de proteínas formados por el ensamblaje de cuatro subunidades. El extremo aminoterminal de cada subunidad contiene 6 dominios transmembrana S1-S6, con el poro situado entre los dominios S5 y S6 y donde el

dominio S1 es responsable de la oligomerización de subunidades. El extremo carboxiterminal está muy conservado y contiene una región de unión a nucleótidos cíclicos y 6 repeticiones de ankirina para facilitar la interacción, tanto entre monómeros como con otras proteínas (Papazian *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1992; Daram *et al.*, 1997; Ehrhardt *et al.*, 1997; Dreyer *et al.*, 1998). En un rastreo de genes de *Arabidopsis* capaces de complementar a mutantes de levadura deficientes en la toma de  $K^+$  (*trk1, trk2*) se aisló el canal de membrana plasmática AKT1 (Sentenac *et al.*, 1992). La expresión de esta proteína es constitutiva y se da principalmente en raíz: tanto en pelos radicales como en epidermis, córtex y endodermis de raíces maduras. En menor medida, se expresa también en hidatodos y en primordios foliares (Lagarde *et al.*, 1996). Estudios electrofisiológicos demostraron que este canal es dependiente de voltaje, selectivo para  $K^+$  y sensible a cGMP (Gaymard *et al.*, 1996). La caracterización fisiológica del mutante *akt1* determinó que este canal es importante en la toma de  $K^+$  de baja afinidad, aunque también puede intervenir en la de alta afinidad si existe  $NH_4^+$  en el medio. AKT1 contribuye al 55-63% de la permeabilidad a  $K^+$  cuando la concentración de este elemento está entre 10 y 1000  $\mu M$ . En presencia de  $NH_4^+$ , sólo AKT1 es capaz de llevar a cabo transporte de  $K^+$  de alta afinidad, ya que este catión bloquea a las proteínas que habitualmente se encargan de este tipo de transporte (Hirsch *et al.*, 1998; Spalding *et al.*, 1999; Dennison *et al.*, 2001). Se han identificado proteínas homólogas a AKT1 en otras especies como SKT1 en patata (Zimmermann *et al.*, 1998), ZMK1 en maíz (Philippar *et al.*, 2003) LKT1 en tomate (Hartje *et al.*, 2000), KDC1 en zanahoria (Downey *et al.*, 2000) y OsAKT1 en arroz (Fuchs *et al.*, 2005). En *Arabidopsis* se identificó también el locus *AtKC1*, que codifica un canal de la familia de AKT1 y se expresa en la membrana plasmática de células de raíces, especialmente en pelos radicales. Los monómeros de *AtKC1* se consideran subunidades silenciosas, ya que este canal no forma homotetrámeros sino que se une a monómeros de otros canales para formar heterotetrámeros y regular su actividad. La formación de heterotetrámeros con AKT1 disminuye la toma de  $K^+$  porque el nuevo canal requiere mayor hiperpolarización para abrirse, pero también dificulta la expulsión de  $K^+$  por despolarización, lo que favorece la tolerancia de las plantas a estrés salino (Reintanz *et al.*, 2002; DUBY *et al.*, 2008). Al igual que sucede con SOS1 (Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002)(ver apartado 1.7.3.2), la actividad de AKT1 también se activa por un complejo CIPK/CBL. El déficit de  $K^+$  incrementa la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  y produce señales transitorias de este catión, que son detectadas tanto por CBL1 como por CBL9. Estas proteínas miristoiladas se unen a CIPK23 para activarla y dirigirla a la membrana plasmática, donde se expresa AKT1. La fosforilación de AKT1 por CIPK23 activa al canal y favorece, por lo tanto, la toma de  $K^+$ . En un ensayo de doble híbrido se identificó la fosfatasa AIP1, que es capaz de interactuar con CIPK23, sugiriéndose que ambas se coordinan para regular al canal AKT1 (Li *et al.*, 2006; Cheong *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007a). La ruta CBL1 y CBL9/CIPK23 también responde, de forma independiente de AKT1, ante estrés por ABA y produce el cierre estomático.

Los transportadores KT/HAK/KUP se identificaron en plantas por su homología con la permeasa de toma de  $K^+$  bacteriana (KUP) y el transportador HAK1 de  $K^+$  de alta afinidad

fúngico (Schleyer y Bakker, 1993; Bañuelos *et al.*, 1995). Todas las proteínas KT/HAK/KUP de Arabidopsis y arroz presentan entre 10 y 14 dominios transmembrana y, excepto OsHAK3, un extremo aminoterminal citoplásmico (Schwake *et al.*, 2003). Sólo *AtKUP1*, *AtKUP4* y *AtHAK5* han sido caracterizados *in planta*. La sobreexpresión de *AtKUP1* en células de Arabidopsis en suspensión demostró la implicación de este transportador en la toma de  $K^+$  de alta afinidad (Kim *et al.*, 1998), si bien su expresión heteróloga en levadura le permitió transportar  $Na^+$  y  $K^+$  con la misma afinidad (Fu y Luan, 1998). El mutante por inserción de T-DNA *kup4* se llamó *trh1* (del inglés *tiny root hair 1*) por la reducida elongación de sus pelos radicales (Rigas *et al.*, 2001). Aunque este mutante presentaba cierta reducción en la toma de  $K^+$  (o  $Rb^+$ ), el fenotipo no se reestableció con el crecimiento de las plantas a alto  $K^+$ . Ensayos posteriores demostraron que este transportador estaba implicado principalmente en la distribución de auxinas en la raíz, si bien podría inhibir la pérdida de  $K^+$  a través de AKT1 cuando las plantas crecen a concentraciones muy bajas de este catión (Desbrosses *et al.*, 2003; Vicente-Agullo *et al.*, 2004). *AtHAK5* se clonó por su homología con otros HAKs, demostrándose inicialmente su capacidad de transportar  $Cs^+$  en condiciones de bajo  $K^+$  (Rubio *et al.*, 2000). De entre todos los miembros de la familia KT/HAK/KUP, es el único cuya expresión en Arabidopsis se induce por ayuno de  $K^+$ , reprimiéndose al aumentar la concentración de este macronutriente o en presencia de  $NH_4^+$  (Ahn *et al.*, 2004; Armengaud *et al.*, 2004; Gierth *et al.*, 2005). Es homólogo de HvHAK1 en cebada y LeHAK5 en tomate, ambos implicados en el transporte de  $K^+$  de alta afinidad e inducidos en respuesta al déficit de este macronutriente (Santa María *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002). Al igual que sus homólogos, ha demostrado ser el principal mecanismo de toma de  $K^+$  de alta afinidad en Arabidopsis, tanto en presencia como en ausencia de salinidad, constituyendo el ~80% de flujo de  $K^+$  en condiciones de déficit. Contribuye a la absorción de  $K^+$  a concentraciones menores que AKT1, asegurando el suministro de este macronutriente cuando su concentración en la solución del suelo es extremadamente baja (Gierth *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2008; Nieves-Cordones *et al.*, 2010). Los principales candidatos a contribuir al 20% residual de transporte de alta afinidad son *AtKUP8* y *AtKUP10*, pues son los más expresados en raíces (Ahn *et al.*, 2004; Zimmermann, 2004; Gierth *et al.*, 2005).

### 1.6.2. Carga de $K^+$ en el xilema.

El  $K^+$  circula por el córtex de la raíz a través de la vía apoplástica (extracelular) o simplástica (intracelular) hasta llegar a la endodermis, donde es descargado desde las células de la estela hacia el xilema para su distribución por toda la planta. El canal SKOR (del inglés, *Stelar  $K^+$  Outward Rectifier*) se identificó buscando secuencias homólogas a canales de  $K^+$  en la región del poro (Gaymard *et al.*, 1998). Este gen se expresa en periciclo y células del parénquima del xilema de raíces. Los mutantes por inserción de T-DNA en este locus mostraron una importante reducción en el contenido de  $K^+$  de la parte aérea, mientras los contenidos en la raíz eran similares. Ensayos electrofisiológicos en oocitos de *Xenopus* demostraron que es responsable de corrientes de salida de  $K^+$  activadas por despolarización

de la membrana plasmática e inhibidas por acidificación del medio extra o intracelular. A raíz de los resultados, se propuso la implicación del canal SKOR en la descarga de  $K^+$  al xilema de la planta para su distribución a la parte aérea. La inhibición de la actividad del canal mediante la acidificación del pH citosólico o extracelular, así como la represión de su transcripción, se realiza a través de ABA *in planta*. En presencia de estrés hídrico, la raíz necesita retener una concentración elevada de  $K^+$  para mantener la turgencia de las células en la zona de crecimiento. El ABA sintetizado en respuesta a estrés inhibe rápidamente a SKOR, impidiendo la translocación de este elemento a la parte aérea (Gaymard *et al.*, 1998; Lacombe *et al.*, 2000a). Además, esta hormona induce la expresión de AKT2, favoreciendo la recirculación floemática de  $K^+$  a la raíz (ver apartado 1.6.3)(Pilot *et al.*, 2003). Las ROS inhiben a SKOR de forma reversible mediante la oxidación de la cisteína que ocupa la posición 168 (García-Mata *et al.*, 2010). La dependencia de voltaje para la activación de este canal la controlan tres aminoácidos: la leucina en la posición 271, el ácido aspártico en la posición 312 y la metionina en la posición 286. Mutaciones de la leucina a asparagina, lisina o ácido aspártico inactivan el canal, mientras que mutaciones a prolina, valina o glicina producen un canal que se activa a un potencial más hiperpolarizado. La mutación del ácido aspártico en la posición 312 a asparagina convierte a SKOR en un canal independiente de voltaje, produciendo un canal afuncional cualquier otra mutación en este aminoácido. La mutación de la metionina 286 a leucina produce un canal activado por hiperpolarización de membrana. SKOR se puede convertir en un poro de  $K^+$  permanentemente abierto e independiente de voltaje si acumula las mutaciones D312N, M313L e I314G (Porée *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Los canales rectificadores de salida de  $K^+$  en plantas se activan ante despolarización de membrana, pero actúan también como sensores de  $K^+$  y sólo se mantienen en su configuración abierta si el gradiente de concentraciones de  $K^+$  es suficientemente alto para permitir la descarga de este catión a través de ellos (Schroeder, 1988; Blatt *et al.*, 1997). SKOR contiene dos dominios de detección de la concentración de  $K^+$ : uno intracelular en su extremo carboxilo y uno intracelular en la región transmembrana cercana al poro (Johansson *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006). Si SKOR detecta bajos niveles de  $K^+$  en la raíz, se inhibe para mantener este nutriente en la raíz en lugar de translocarlo a los sumideros de la parte aérea (Liu *et al.*, 2006).

### **1.6.3. Recirculación floemática de $K^+$ .**

En condiciones de déficit de  $K^+$ , las plantas necesitan mantener la mayor cantidad posible de este elemento en las raíces en desarrollo. Además de inhibir su carga en el xilema, activan un mecanismo de recirculación desde la parte aérea hasta la raíz a través del floema. En *Arabidopsis* se han identificado dos canales rectificadores de entrada de  $K^+$  de tipo “*Shaker*” encargados del transporte de este catión a través del floema: AKT2 y KAT2 (Cao *et al.*, 1995; Pilot *et al.*, 2001).

AKT2, a diferencia de AKT1, no se expresa en raíces sino en hojas, principalmente en el floema aunque también en mesófilo, epidermis y células guarda (Lacombe *et al.*, 2000b). Su

expresión heteróloga en cepas de levadura *trk1, trk2* no complementa el déficit en la toma de  $K^+$  y mediante ensayos electrofisiológicos en oocitos de *Xenopus* se demostró que es un canal de  $K^+$  independiente de voltaje, con débil rectificación y sensible a la acidificación del medio extracelular y a la adición de  $Ca^{2+}$  (Cao *et al.*, 1995; Marten *et al.*, 1999; Lacombe *et al.*, 2000b; Dennison *et al.*, 2001). Su expresión se induce por luz y se reprime por  $CO_2$  y el mutante *akt2* muestra un menor contenido de  $K^+$  y azúcares en el floema, por lo que se relacionó este canal con la recirculación de  $K^+$  y el transporte de fotosintatos (Deeken *et al.*, 2000, 2002). Recientemente se ha descubierto que la recirculación de  $K^+$  a través del floema, que es favorecida mediante modificaciones posttranscripcionales que convierten a AKT2 en un canal débilmente rectificador e impedida por las que lo convierten en un canal rectificador de entrada, es utilizada por las plantas para crear un gradiente electroquímico. Éste puede ser utilizado para la carga de azúcares en el floema, compensando limitaciones locales de energía que pueden ser debidas a la disminución en la concentración de ATP, inhibición de la actividad de la  $H^+$ -ATPasa o incremento de la concentración de sacarosa en el apoplasto. (Gajdanowicz *et al.*, 2011). Por otra parte, como ya se ha comentado anteriormente, su expresión se induce en presencia de ABA para aumentar la disponibilidad de  $K^+$  en la raíz en presencia de estrés abiótico (Pilot *et al.*, 2003). Se ha demostrado en ensayos de doble híbrido la interacción de AKT2 con la fosfatasa PP2CA, que podría desfosforilar al canal para contrarrestar su inducción por ABA (Chérel *et al.*, 2002).

KAT2 se expresa en el floema de hojas y en células guarda colocalizando con KAT1, con el que puede formar complejos heteromultiméricos para regular la apertura y cierre de los estomas. Ensayos en oocitos de *Xenopus* demuestran que este canal produce corrientes rectificadoras de entrada de  $K^+$  dependientes de voltaje y sensibles a la acidificación del pH externo, que permite su activación a potenciales de membrana menos hiperpolarizados (Pilot *et al.*, 2001). En cotiledones en desarrollo, KAT2 se induce al aumentar la concentración de auxinas, posiblemente para producir la diferenciación de tejidos vasculares dependiente del potencial de membrana (Philippar *et al.*, 2004). En maíz se ha clonado el homólogo de este canal, KZM1. Comparte localización, funciones y características electrofisiológicas con KAT2 pero a diferencia de éste, es insensible a variaciones en el pH (Philippar *et al.*, 2003). Se ha demostrado que AKT2 y KAT2 son capaces de formar heteromultímeros, ya que en las células de compañía del floema, donde se expresan ambas proteínas, se producen corrientes iguales que las de KAT2 en cuanto a su dependencia del tiempo y del voltaje pero con la sensibilidad a  $Ca^{2+}$  y pH propias de AKT2 (Ivashikina *et al.*, 2005).

#### **1.6.4. Regulación de la transpiración mediante apertura y cierre estomático.**

Las células guarda regulan la apertura y cierre de los estomas debido a la entrada y salida respectivamente de  $K^+$ ,  $Cl^-$  y malato, que alteran su turgencia. El ABA inducido ante estrés hídrico y osmótico provoca despolarización de la membrana plasmática, alcalinización del citoplasma y apertura de canales de entrada de  $Ca^{2+}$  en las células guarda. El exceso de

CO<sub>2</sub> también produce despolarización y alcalinización de este tipo de células. Mientras el Ca<sup>2+</sup> activa a los canales de entrada de aniones, los canales de entrada/salida de K<sup>+</sup> se activan por la acidificación/alcalinización del pH e hiperpolarización/despolarización de la membrana. El control de la apertura y cierre estomáticos es muy importante para controlar las relaciones hídricas de la planta, así como la fijación de CO<sub>2</sub> (MacRobbie, 1998; Hedrich *et al.*, 2001).

Ensayos de RT-PCR cuantitativa para los distintos canales de tipo “*Shaker*” en protoplastos de células guarda mostraron un nivel de expresión alto para *KAT1*, moderado para *GORK*, *KAT2* y *AKT1*, bajo para *AKT2* y *AtKC1* y nulo para *SKOR*, *AKT5* y *AKT6* (Szyroki *et al.*, 2001). *KAT1* es un canal rectificador de entrada de K<sup>+</sup> que se expresa en células guarda e interviene en la apertura estomática (Schachtman *et al.*, 1991; Nakamura *et al.*, 1995a; Ichida *et al.*, 1997). La expresión de canales *KAT1* con mutaciones dominantes negativas en *Arabidopsis* produjo plantas en las que la disminución en las corrientes de entrada de K<sup>+</sup> en las células guarda redujo la apertura estomática (Kwak *et al.*, 2001). Se ha demostrado que su homólogo *KAT2*, con quien puede formar heteromultímeros, muestra unas características más propias de canales de entrada de K<sup>+</sup> en células guarda como la mayor sensibilidad a la acidificación del pH extracelular o la abundancia de regiones en su secuencia que permiten su regulación pre y post-traducciona, por lo que se ha especulado que su importancia en la apertura estomática podría ser mayor que la de *KAT1* (Pilot *et al.*, 2001). La caracterización del mutante *kat1* de *Arabidopsis* no reveló diferencias con la línea silvestre en cuanto a morfología, tamaño o número de cloroplastos en las células guarda. Tampoco se vio alterado el comportamiento de los estomas frente a CO<sub>2</sub>, luz, ABA o niveles bajos de K<sup>+</sup> en el apoplasto, si bien la permeabilidad a K<sup>+</sup> se mostró más sensible a la adición de Ca<sup>2+</sup>. De los canales expresados en células guarda, sólo *AKT2* es sensible al bloqueo por Ca<sup>2+</sup>, lo que sugiere la interacción de esta subunidad con complejos del tipo proteína-quinasa/proteína-fosfatasa dependientes de Ca<sup>2+</sup> para su regulación (Ivashikina *et al.*, 2005). A raíz de los resultados anteriormente expuestos, se puede concluir que la apertura de los estomas por la entrada de K<sup>+</sup> en las células guarda no se debe exclusivamente a *KAT1*, sino que también intervienen canales insensibles (posiblemente *AKT1* y *KAT2*) y sensibles a Ca<sup>2+</sup> (*AKT2*) (Szyroki *et al.*, 2001).

La proteína *GORK* es un canal rectificador de salida de K<sup>+</sup> que se activa por despolarización celular y no se inhibe por pH ácido como los canales de entrada. Su activación es más rápida cuando la concentración de K<sup>+</sup> extracelular es baja, por lo que también actúa como sensor. Se expresa en células guarda y pelos radicales, permitiendo el cierre estomático y la detección de la concentración de K<sup>+</sup> en la solución del suelo (Ache *et al.*, 2000; Ivashikina *et al.*, 2001). La disrupción del gen *GORK* por inserción de T-DNA produjo plantas mutantes de *Arabidopsis* con excesivas pérdidas de agua por evapotranspiración debido a su incapacidad para cerrar los estomas. (Hosy *et al.*, 2003). En presencia de ABA inducido ante estrés hídrico, las kinasas *CPK21* y *CPK23*, activan al canal de salida de aniones *SLAC1*, lo que produce la liberación de K<sup>+</sup> a través de *GORK* como consecuencia de la despolarización celular (Becker *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2007; Geiger *et al.*, 2010).



## I.7 Transporte de Na<sup>+</sup> en plantas.

### I.7.1. Absorción de Na<sup>+</sup>.

Bajo condiciones fisiológicas normales, las plantas tienden a mantener un alto cociente K<sup>+</sup>:Na<sup>+</sup> en el citosol, con concentraciones de K<sup>+</sup> de 100-200 mM y 1-10 mM de Na<sup>+</sup>. El aumento en la concentración extracelular de Na<sup>+</sup> establece un alto gradiente de concentraciones que, unido al potencial de membrana negativo (-140 mV), favorece la entrada pasiva de este catión al citosol (Higinbotham, 1974; Niu *et al.*, 1995). Al igual que el K<sup>+</sup>, el Na<sup>+</sup> es transportado en un flujo radial por el córtex de la raíz, a través de las vías apoplástica y simplástica, hasta llegar a la endodermis, donde la presencia de la barrera impermeable formada por la banda de Caspari obliga a que el flujo hacia la estela pase por la vía simplástica. Una parte del transporte puede continuar por la vía apoplástica en las discontinuidades que presenta la endodermis en los ápices radiculares o en las zonas de emergencia de las raíces secundarias (Tester y Leigh, 2001). Tester y Davenport (2003) clasificaron las vías de entrada de Na<sup>+</sup> en las raíces en tres grupos: simplásticas sensibles a Ca<sup>2+</sup>, simplásticas independientes de Ca<sup>2+</sup> y apoplástica. La importancia de cada vía depende de la especie y condiciones de cultivo.

#### I.7.1.1. Mecanismos sensibles a Ca<sup>2+</sup>.

La supresión parcial de la toxicidad sódica en plantas mediante la adición de hasta 10 mM de Ca<sup>2+</sup> a la solución externa es un fenómeno conocido desde hace mucho (Cramer *et al.*, 1985). Este efecto, además de estar causado por la activación de la ruta SOS de señalización (Liu y Zhu, 1998) se debe a la inhibición del flujo de entrada de Na<sup>+</sup> (Davenport y Tester, 2000), siendo los canales no selectivos de cationes (NSCC) la vía más probable de entrada de Na<sup>+</sup> sensible a Ca<sup>2+</sup> (Amtmann y Sanders, 1999; Tyerman y Skerret, 1999; Zhu, 2003; Rus *et al.*, 2004). Dentro de la familia de los NSCC, las principales subfamilias de canales candidatos son los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC) y los canales activados por glutamato (GLR) (Lacombe *et al.*, 2001; Leng *et al.*, 2002).

Los CNGC se expresan en raíz y están implicados en la toma de cationes (Sunkar *et al.*, 2000; White *et al.*, 2002). Aunque la inhibición de la toma de Na<sup>+</sup> *in planta* mediante la adición de nucleótidos cíclicos parece demostrar la implicación de los CNGCs en esta mejora de la halotolerancia (Maathuis y Sanders, 2001), la expresión de estas proteínas de plantas en oocitos de *Xenopus* mostró que la adición de cAMP no inhibía sino que activaba corrientes de entrada de Na<sup>+</sup> a través de AtCNGC1, AtCNGC2 y AtCNGC4 de *Arabidopsis* y NtCBP4 de tabaco (Leng *et al.*, 2002; Balagué *et al.*, 2003). También la expresión heteróloga en levadura parece contradecir los resultados *in planta*, ya que la supresión del fenotipo de sensibilidad a bajo K<sup>+</sup> de un mutante *trk1, trk2* de levadura por AtCNGC2 se activó por cAMP (Leng *et al.*, 2002). El canal AtCNGC3 parece estar implicado en la toma de Na<sup>+</sup>, ya que el mutante *cngc3*

de *Arabidopsis* mostró mayor tolerancia que la línea silvestre a concentraciones altas de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  en el medio y la expresión heteróloga de este gen en mutantes de levadura deficientes en las bombas  $\text{Na}^+$ -ATPasa ENA1-4 aumentó la acumulación de  $\text{Na}^+$  (Gobert *et al.*, 2006). A la vista de los datos anteriores, parece lógico postular que la mejora de la halotolerancia producida por los nucleótidos cíclicos se debe a la activación de alguna proteína distinta de los CNGCs. El antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1 podría ser un candidato, ya que contiene un dominio putativo de unión a nucleótidos cíclicos comprendido entre los aminoácidos 745 y 997 (Quintero *et al.*, 2011). Aunque se desconocen las implicaciones fisiológicas de los resultados, análisis transcriptómicos en *Arabidopsis* revelaron que el estrés salino induce la expresión de *AtCNGC1*, *AtCNGC19* y *AtCNGC20* en raíz y de *AtCNGC3*, *AtCNGC8* y *AtCNGC19* en parte aérea (Maathuis, 2006).

También se ha postulado la implicación de los GLRs en la adquisición de  $\text{Na}^+$ , a raíz de la mayor toma de este catión en plantas tras la adición de glutamato y la similitud de estas proteínas con los receptores ionotrópicos de glutamato en neuronas de vertebrados (iGLRs), que controlan la transmisión del impulso nervioso mediante el transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Lam *et al.*, 1998). Sin embargo, los GLRs caracterizados hasta la fecha muestran actividad nula, como AtGLR2.8, actividad independiente de glutamato, como AtGLR3.4, o implicación en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática, como AtGLR3.3. Estos resultados, junto con el incremento transitorio en *Arabidopsis* de los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de glutamato, sugieren la participación de estas proteínas en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y no  $\text{Na}^+$  en la célula (Demidchik *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2006).

Finalmente, la proteína LCT1 (*Low Affinity Cation Transporter 1*) de trigo, con una estructura distinta a la del resto de transportadores iónicos de plantas superiores, permite la toma de baja afinidad de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Na}^+$  y causa sensibilidad a  $\text{Na}^+$  al ser expresada en levadura. La entrada de  $\text{Na}^+$  se redujo mediante la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque la similitud entre su selectividad iónica y la de los sistemas de transporte de cationes propios de levadura podría indicar que esta proteína actúa mediante la estimulación de transportadores iónicos endógenos (Schachtman *et al.*, 1997; Clemens *et al.*, 1998; Amtmann *et al.*, 2001).

#### **1.7.1.2. Mecanismos insensibles a $\text{Ca}^{2+}$ .**

Además de ser causada por el componente insensible a  $\text{Ca}^{2+}$  de los NSCC (Tester y Davenport, 2003), la toma de  $\text{Na}^+$  insensible a  $\text{Ca}^{2+}$  podría deberse a los transportadores de tipo HKT, emparentados con los transportadores de  $\text{K}^+$  TRK de levadura y KtrB, KdpA y TrkH de bacteria (Durell y Guy, 1999). El transportador TaHKT2;1 de trigo fue el primero en identificarse. Cuando se expresa en oocitos de *Xenopus* o levadura cataliza un simporte de alta afinidad de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a concentraciones micromolares de  $\text{Na}^+$  o un uniporte de  $\text{Na}^+$  de baja afinidad a concentraciones milimolares de este catión, siendo el flujo insensible a  $\text{Ca}^{2+}$  (Rubio *et al.*, 1995; Tyerman y Skerrett, 1999). Los genes *Kna1* de trigo blando y *Nax2* de la línea 149 de trigo duro obtenida por cruzamiento entre *T. monococcum* y *T. durum*, implicados en

tolerancia a salinidad, se ubicaron por mapeo cromosómico en las regiones distales 4DL y 5A1 respectivamente. Ambas regiones son homeólogas y codifican un transportador similar a OsHKT1;5, que podría ser el responsable del papel de estos loci de trigo en el mantenimiento de un bajo contenido de  $\text{Na}^+$  y un alto cociente  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en las hojas (Gorham *et al.*, 1990; James *et al.*, 2006; Byrt *et al.*, 2007). En arroz se han identificado transportadores que, al igual que TaHKT2;1, pueden funcionar como uni o simportadores (OsHKT2;2), uniportadores específicos de  $\text{Na}^+$  como OsHKT2;1, OsHKT1;3 y OsHKT1;1 o uniportadores de  $\text{K}^+$  como OsHKT2;4. OsHKT2;2, que muestra un 93% de homología con OsHKT2;1, cotransporta  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en levadura, oocitos de *Xenopus* y en células BY2 de tabaco, además de ser capaz de uniportar  $\text{Na}^+$  en estas últimas cuando la concentración de este catión en el medio se encuentra en el rango milimolar (Horie *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2010). OsHKT2;1 cataliza la toma de  $\text{Na}^+$  de alta afinidad en condiciones de baja salinidad y déficit de  $\text{K}^+$  (cuando la toma de  $\text{Na}^+$  es beneficiosa para suplir al  $\text{K}^+$  en el mantenimiento de la turgencia y crecimiento celular) pero se reprime rápidamente ante estrés salino para evitar la toxicidad sódica (Horie *et al.*, 2001; Garcíadeblás *et al.*, 2003; Horie *et al.*, 2007; Horie *et al.*, 2011). OsHKT1;1 y OsHKT1;3 muestran permeabilidad exclusiva para  $\text{Na}^+$  en oocitos de *Xenopus*, con corrientes exclusivamente de entrada en el caso de OsHKT1;1 o de entrada y salida en el de OsHKT1;3 (Jabnourne *et al.*, 2009). OsHKT2;4 es un transportador de membrana plasmática con capacidad para transportar  $\text{K}^+$  pero no  $\text{Na}^+$  y que muestra cierta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , si bien ésta es inhibida competitivamente por el  $\text{K}^+$  (Horie *et al.*, 2011). En cebada HvHKT2;1, cuya expresión se induce en condiciones de déficit de  $\text{K}^+$  en toda la planta y a altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  en parte aérea, es capaz de transportar  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  al expresarse heterológamente en levadura. Plantas transgénicas de *Arabidopsis* sobreexpresando este gen mostraron mayor compartimentación de  $\text{Na}^+$  que se tradujo en mayor resistencia a estrés salino, sugiriendo que esta proteína favorece la inclusión de este catión en el tejido foliar (Haro *et al.*, 2005; Mian *et al.*, 2011). En *Thellungiella salsuginea* se han clonado dos transportadores de tipo HKT: TsHKT1;1 y TsHKT2;1. El segundo muestra un mayor nivel de expresión y complementó mejor los fenotipos de sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y déficit de  $\text{K}^+$  al ser sobreexpresado en el mutante *hkt1;1* de *Arabidopsis*. La preferencia de TsHKT2;1 por  $\text{K}^+$  frente a  $\text{Na}^+$  en ensayos de expresión heteróloga en levadura sugiere una contribución a la halotolerancia de *T. salsuginea* mediante el mantenimiento de la toma de  $\text{K}^+$  a elevadas concentraciones de  $\text{Na}^+$  en el medio (Ali *et al.*, 2012).

El único representante de esta familia en *Arabidopsis* es AtHKT1;1. Funciona como uniportador específico de  $\text{Na}^+$  en oocitos de *Xenopus* y levadura pero puede complementar a un mutante de *E. coli* deficiente en la toma de  $\text{K}^+$  (Uozumi *et al.*, 2000). Los mutantes *hkt1* muestran hipersensibilidad a sal y mayor contenido en  $\text{Na}^+$  en parte aérea, aunque menor en raíz (Rus *et al.*, 2001; Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Rus *et al.*, 2006). En principio, dada la supresión parcial del fenotipo de *sos3* por parte de la mutación *hkt1*, se propuso su papel en la entrada de  $\text{Na}^+$  a través de la raíz (Rus *et al.*, 2001). Sin embargo, medidas posteriores de la toma de  $\text{Na}^+$  en raíces demostraron que la toma de este catión no

era menor en el mutante (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005). Dada su afinidad por el  $\text{Na}^+$ , su localización en células del parénquima del xilema y floema y el fenotipo de los mutantes, su función se ha relacionado con el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia. En un principio se postuló que realizaría esta función mediante la recirculación de  $\text{Na}^+$  a través del floema, si bien estudios posteriores descartaron esta hipótesis al demostrar el papel de HKT1;1 en la descarga de  $\text{Na}^+$  del xilema a las células parenquimáticas, acción que se coordinaría con la carga de este catión en el xilema por SOS1 (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Davenport *et al.*, 2007; Olías *et al.*, 2009). Se han realizado numerosos estudios sobre el efecto de la alteración del nivel de expresión de este transportador en la homeostasis iónica. Si bien su sobreexpresión constitutiva tanto en arroz como en Arabidopsis produce plantas hipersensibles a altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y déficit en  $\text{K}^+$ , su sobreexpresión en tipos celulares específicos de la raíz como la estela o el periciclo mejoró la halotolerancia mediante la disminución del contenido en  $\text{Na}^+$  de la parte aérea y el aumento del de  $\text{K}^+$  (Rus *et al.*, 2004; Møller *et al.*, 2009; Plett *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2011). En la naturaleza se han encontrado entradas de Arabidopsis, como los ecotipos Ts-1 y Tsu-1, en los que alelos hipofuncionales de *HKT1;1* mejoraban la halotolerancia de la planta. Estos alelos, cuya frecuencia aumenta en toda Europa en costas y zonas salinizadas, incrementan el contenido de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea a niveles subtóxicos que la planta es capaz de compartimentar en la vacuola sin llegar a saturarse como sucede en los mutantes *hkt1;1* (Rus *et al.*, 2004; Baxter *et al.*, 2010). El tratamiento de plantas de Arabidopsis con la rizobacteria GB03 mejora la halotolerancia mediante la regulación de la expresión de HKT1;1: la aumenta en parte aérea para reducir su contenido en  $\text{Na}^+$  y la reduce en raíz para aumentar el de  $\text{K}^+$  (Zhang *et al.*, 2008). Además, HKT1;1 regula la distribución de  $\text{K}^+$  a través de la planta, favoreciendo la mayor acumulación en parte aérea y menor en raíz de este catión. Puesto que este transportador no muestra afinidad por el  $\text{K}^+$ , este efecto parece ser indirecto y debido a la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las células del parénquima xilemático, que activaría por despolarización a los canales de salida de  $\text{K}^+$ . (Rus *et al.*, 2004; Sunarpi *et al.*, 2005; Møller *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2011).

### **1.7.1.3. Vía apoplástica.**

La última vía de entrada de  $\text{Na}^+$  es a través del apoplasto. En plantas de arroz, la tolerancia a  $\text{Na}^+$  es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y existe una correlación entre toma de  $\text{Na}^+$  y flujo apoplástico (Yadav *et al.*, 1996; Yeo *et al.*, 1999). Estos datos parecen indicar que en arroz la principal fuente de entrada de  $\text{Na}^+$  no es a través de la vía simplástica, sino de discontinuidades en la endodermis en ápices radiculares o puntos de emergencia de raíces secundarias. La contribución de esta tercera vía de entrada de  $\text{Na}^+$  varía mucho entre especies. En trigo, este flujo es diez veces menor que en arroz (García *et al.*, 1997). En plantas de Arabidopsis cultivadas en medios con bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , las tres vías contribuyen por igual (Essah *et al.*, 2003).

### 1.7.2. Compartimentación de Na<sup>+</sup> en la vacuola.

La compartimentación del exceso de Na<sup>+</sup> en las vacuolas, además de contribuir a la expansión celular en un medio hipertónico, es un mecanismo de vital importancia en la tolerancia de las plantas al estrés salino. El Na<sup>+</sup> es de este modo excluido del citosol, donde su sobreacumulación es tóxica para numerosas enzimas. Además, la compartimentación en la vacuola permite su ajuste osmótico, facilitando la toma de agua (Hasegawa *et al.*, 2000; Blumwald *et al.*, 2000). El transporte de Na<sup>+</sup> a través del tonoplasto requiere energía, por lo que está acoplado al gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> establecido por la H<sup>+</sup>-ATPasa de tipo V y la H<sup>+</sup>-PPasa (Blumwald *et al.*, 2000). El primer intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> vacuolar de plantas en identificarse fue AtNHX1 (Gaxiola *et al.*, 1999). Muestra similitud en su secuencia con los antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHE de mamíferos y ScNHX de levadura (Nass *et al.*, 1997; Counillon y Pouysségur, 2000). Presenta además la secuencia consenso FF(I/L)(Y/F)LFLLPPI de unión a amilórido, que funciona como inhibidor de esta familia de proteínas (Putney *et al.*, 2002; Sato y Sakaguchi, 2005).

El análisis del genoma de *Arabidopsis* indicó la presencia de 6 transportadores de tipo NHX, que se pueden clasificar en dos grupos: los de clase I (AtNHX1-4) se localizan en la vacuola y catalizan intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> con la misma afinidad, mientras los de clase II (AtNHX5 y 6) son endosomales y muestran preferencia por el K<sup>+</sup> (Yokoi *et al.*, 2002b; Venema *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2006; Jiang *et al.* 2010; Bassil *et al.*, 2011). La sobreexpresión de *NHX3* en plantas de *Arabidopsis* mejora su germinación y crecimiento en condiciones de alta salinidad, además de aumentar su capacidad antiportadora K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Los mutantes de pérdida de función *nhx3* muestran déficit de crecimiento en medios pobres en K<sup>+</sup>, así como menor acumulación de este catión y mayor de Na<sup>+</sup> que las plantas silvestres (Liu *et al.*, 2010). Los mutantes *nhx4* presentan resistencia a elevadas concentraciones de Na<sup>+</sup> y menor acumulación de este catión, mientras que la expresión heteróloga de *NHX4* en *E. coli* aumenta su sensibilidad a Na<sup>+</sup>, especialmente si se utiliza la proteína truncada en su extremo carboxiterminal, que parece funcionar como dominio regulador. A la vista de los fenotipos, se ha sugerido la implicación de estas proteínas en la regulación de la homeostasis de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> respectivamente (Wang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). AtNHX5 y AtNHX6 pertenecen al mismo clado de transportadores endosomales que SINHX2 de tomate, ScNHX1 de levadura y NHE6,7 y 9 humanos, a diferencia de los AtNHX1-4 de *Arabidopsis* (Brett *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2006). Dada su gran similitud de secuencia (homología >68%) y patrón de expresión, así como la ausencia de fenotipos de los mutantes simples *nhx5* y *nhx6*, se concluyó que ambas proteínas son funcionalmente redundantes, por lo que se obtuvo el doble mutante *nhx5 nhx6*. Éste presentaba menor crecimiento en roseta y raíces, desarrollo retrasado y sensibilidad a NaCl. El tráfico de vesículas se encontraba inhibido entre la red trans-Golgi y el compartimento prevacuolar y un análisis transcriptómico reveló alteraciones en la transcripción de genes relacionados con la respuesta a ABA y con el tráfico de vesículas.

Estos resultados, junto con la localización de ambas proteínas en los compartimentos endosomales del Golgi y la red trans-Golgi sugieren la función de ambos transportadores en la regulación del pH y la homeostasis de  $K^+$  necesarios para el correcto transporte endosómico (Bassil *et al.*, 2011a).

Estudios realizados con el mutante de pérdida de función de *AtNHX1* por inserción de T-DNA mostraron que las plantas mutantes eran más sensibles a estrés salino, con menor actividad antiportadora  $Na^+/H^+$  y  $K^+/H^+$  y desarrollo foliar alterado con menor frecuencia de células epidérmicas grandes, sugiriendo su contribución tanto a la homeostasis de estos dos cationes como a procesos de desarrollo y ciclo celular (Apse *et al.*, 2003). El análisis transcriptómico de este mutante sometido a estrés salino puso de manifiesto su papel en el mantenimiento de la homeostasis iónica, respuesta a estrés hídrico y tráfico de vesículas, habiéndose demostrado ya anteriormente esta última función en su homólogo en levadura *Nhx1* (Ali *et al.*, 2004; Sottosanto *et al.*, 2004, 2007). La expresión heteróloga de *AtNHX1* en la cepa de levadura mutante *nhx1* suprimió el fenotipo de sensibilidad a  $Na^+$  y  $Li^+$  (Gaxiola *et al.*, 1999; Quintero *et al.*, 2000) y la sobreexpresión de distintos transportadores NHX se empleó como herramienta biotecnológica para la mejora de la tolerancia a estrés salino en numerosas especies (Apse *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001; Zhang y Blumwald, 2001; Ohta *et al.*, 2002; Fukuda *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005), lo que llevó a la extendida creencia de que las proteínas NHX se encargan de la compartimentación vacuolar del exceso de  $Na^+$  en plantas sometidas a estrés salino. Sin embargo, el análisis de los contenidos iónicos produjo resultados contradictorios, ya que no existe una correlación evidente entre la mayor tolerancia a salinidad mostrada por las distintas especies y su mayor acumulación de  $Na^+$  en las vacuolas. (Pardo *et al.*, 2006; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010). Ensayos de transporte con vesículas de tonoplasto aisladas de tomate, proteoliposomas artificiales en los que *AtNHX1* era el único transportador y vacuolas de una cepa de levadura carente de los antiportadores endógenos del tonoplasto demostraron que *AtNHX1* cataliza los antiportes  $Na^+/H^+$  y  $K^+/H^+$  con la misma afinidad (Zhang y Blumwald, 2001; Venema *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2009). Además, la unión en condiciones fisiológicas, pH ligeramente ácido y presencia de  $Ca^{2+}$  de *AtCAM15*, una proteína similar a calmodulina, favorece la afinidad de *AtNHX1* por el  $K^+$  respecto al  $Na^+$  (Yamaguchi *et al.*, 2005). En ensayos realizados en nuestro laboratorio (Leidi *et al.*, 2010), la sobreexpresión de *AtNHX1* en tomate produjo plantas con mayor tolerancia a choque salino y mayor toma de  $K^+$ , aunque mostraron síntomas de déficit como la inducción de *HAK5*. Análisis electrofisiológicos y por SEM/EDX demostraron que las plantas transgénicas acumulaban más  $K^+$  en la vacuola y menos en el citosol sin verse afectadas en los contenidos de  $Na^+$ .

*AtNHX2* muestra una homología del 87,5% con *AtNHX1*. Ambas son las que más se expresan en toda la planta, con expresión ubicua y muy similar que se induce por estrés salino, KCl, estrés osmótico y ABA. Dadas sus similitudes, se cree que existe solapamiento funcional entre las dos proteínas (Quintero *et al.*, 2000; Shi y Zhu, 2002; Yokoi *et al.*, 2002b; Li *et al.*, 2004; Bassil *et al.*, 2011b; Barragán *et al.*, 2012). En ensayos realizados en nuestro laboratorio,

los mutantes simples *nhx1* y *nhx2* mostraron fenotipos similares, con ligera reducción de la germinación a elevadas concentraciones de NaCl, acumulación de Na<sup>+</sup> en cultivo hidropónico menor en parte aérea y mayor en raíz, y alta sensibilidad a concentraciones de K<sup>+</sup> extremas, lo que sugiere su implicación en la homeostasis de K<sup>+</sup> en la planta (Barragán *et al.*, 2012). La posible redundancia funcional entre NHX1 y NHX2 llevó a la obtención y caracterización del doble mutante *nhx1 nhx2*. En ausencia de estrés, mientras los mutantes simples *nhx1* y *nhx2* no mostraban ningún fenotipo, el doble mutante presentó menor tamaño de la roseta, células más pequeñas, hipocotilos más cortos en plántulas etioladas, estambres anormales y silicuas más pequeñas y escasas. Ensayos de SEM/EDX en hojas y de microscopía confocal en raíces inyectadas con el tinte PBF1-AM demostraron la menor capacidad del doble mutante para compartimentar K<sup>+</sup> en las vacuolas, así como el pH más ácido de éstas, y la presencia de estomas aberrantes. (Bassil *et al.*, 2011b; Barragán *et al.*, 2012). Los ensayos electrofisiológicos en células epidérmicas de raíz mostraron un mayor contenido de K<sup>+</sup> en el citosol, donde se acumuló al no poder ser importado a la vacuola, lo que se tradujo en una menor toma de Rb<sup>+</sup> por sistemas de transporte de alta afinidad (Barragán *et al.*, 2012). Aunque el polen del doble mutante no mostraba diferencias con el de la línea silvestre en su germinación y viabilidad, se observó por SEM/EDX la menor elongación de los filamentos del estambre, así como una severa reducción de la dehiscencia en las anteras, lo que se tradujo en la menor producción de semillas y silicuas observada (Bassil *et al.*, 2011b). En ensayos en cultivo hidropónico realizados en nuestro laboratorio (Barragán *et al.*, 2012), la sensibilidad a NaCl del doble mutante fue similar a la de la línea silvestre, mientras que su crecimiento disminuía progresivamente al aumentar la concentración de K<sup>+</sup> del medio de cultivo, aliviándose parcialmente este efecto mediante la suplementación con NaCl. Estos resultados son similares a los obtenidos por Bassil *et al.* (2011b) *in vitro*. Dado el elevado nivel de expresión de *NHX1* y *NHX2* en células guarda, así como la alteración de las relaciones hídricas observada en el doble mutante *nhx1 nhx2*, se decidió analizar su tolerancia a estrés osmótico y su conductividad estomática (Barragán *et al.*, 2012). El choque osmótico inducido mediante tratamiento con polietilenglicol (PEG) produjo una reducción del contenido de agua mucho mayor en la línea *nhx1 nhx2*, que no sobrevivió al tratamiento y mostró una respuesta estomática (evaluada mediante la determinación de la conductividad utilizando un analizador infrarrojo de gases) más lenta. La tasa de fotosíntesis se vio muy afectada en el doble mutante sometido a tratamiento osmótico y la medida de la presión celular a lo largo del día reveló menor turgencia celular en el doble mutante, así como menor capacidad para osmorregular ante estrés osmótico o con los ritmos circadianos. En conjunto, estos resultados demuestran el papel de los antiportadores NHX1 y NHX2 en el mantenimiento de la homeostasis de K<sup>+</sup> en el tonoplasto, esencial para la expansión celular, producción de semillas y mantenimiento de las relaciones hídricas en la planta.

### 1.7.3. Expulsión y transporte a larga distancia de Na<sup>+</sup>.

El exceso de Na<sup>+</sup> que llega al citoplasma de las células se elimina por extrusión o por compartimentación vacuolar. En células maduras, ambos mecanismos se coordinan para que la entrada de Na<sup>+</sup> no supere la capacidad de almacenamiento. Las células meristemáticas carecen de sistema vacuolar desarrollado, por lo que en ellas el mecanismo más eficiente de exclusión del Na<sup>+</sup> es la extrusión. La expulsión del Na<sup>+</sup> desde una célula podría ser perjudicial para las células de su alrededor, debiendo distribuirse este catión por la planta a través del xilema y el floema de una forma coordinada para evitar sus efectos tóxicos (Tester y Davenport, 2003).

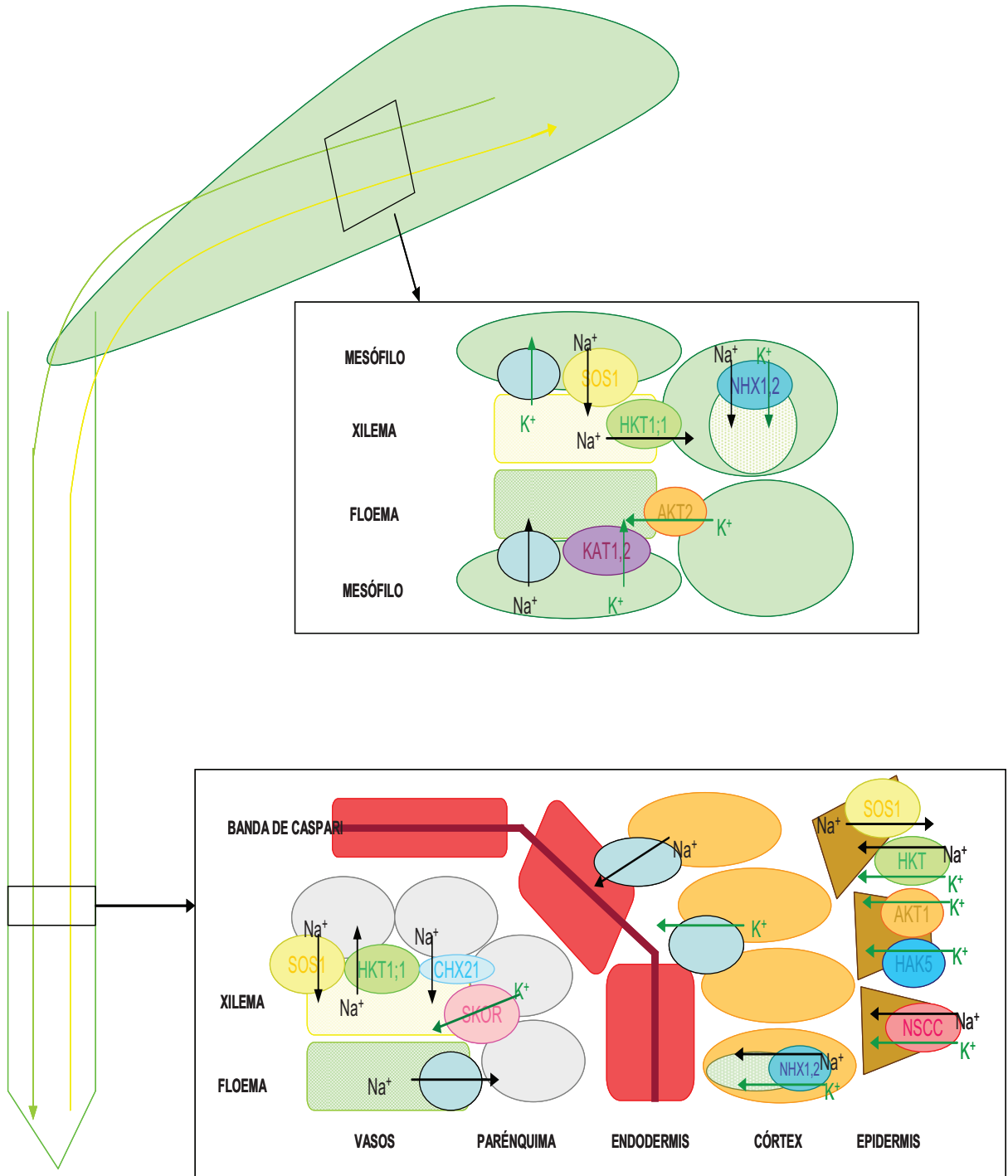
En base a ensayos de transporte, su patrón de expresión y el fenotipo de los mutantes de pérdida de función, se ha implicado al antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> SOS1 en estos dos procesos (Wu *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998; Liu y Zhu, 1998; Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2003)(ver apartado 1.7.3.1). Mediante ensayos inmunológicos y la fusión traduccional de SOS1 con el gen testigo GFP, se comprobó la localización de esta proteína en la membrana plasmática de la célula (Shi *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002). A su vez, la fusión de su promotor al gen GUS reveló un gran nivel de expresión de SOS1 en células epidérmicas de los ápices radicales, así como en las células del parénquima del xilema en raíces y tallos. En el ápice de la raíz juega un papel crucial en la extrusión de Na<sup>+</sup> para evitar su sobreacumulación, ya que las células epidérmicas están indiferenciadas y carecen de un sistema vacuolar desarrollado que les permita compartimentar el exceso de este catión (Shi *et al.*, 2002).

Por otra parte, la expresión en las células del parénquima que bordean al xilema sugería su implicación en el transporte de Na<sup>+</sup> a larga distancia. Cultivado a altas concentraciones de sal (100 mM NaCl) el mutante *sos1* acumula más Na<sup>+</sup> que la línea silvestre, mostrando un mayor contenido de este catión en la savia del xilema (Shi *et al.*, 2002). Sin embargo, sometido a estrés salino moderado (25 mM NaCl), el mutante acumula menos Na<sup>+</sup> (Ding y Zhu, 1997). A raíz de estos resultados aparentemente contradictorios se sugirió que SOS1 actuaría cargando el Na<sup>+</sup> en el xilema para su almacenaje en células del mesófilo ante estrés moderado. El intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en el xilema se favorecería energéticamente por el pH ligeramente ácido de la savia (Fisher *et al.*, 2000). Posteriormente, la caracterización de HKT1;1 como transportador de Na<sup>+</sup> implicado en la descarga de este catión a las células parenquimáticas del xilema (Rus *et al.*, 2001; Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Davenport *et al.*, 2007)(ver apartado 1.7.1.2) llevó al establecimiento de un modelo más completo en el que las proteínas SOS1 y HKT1;1 coordinarían sus flujos opuestos de carga y descarga de Na<sup>+</sup> en el xilema para conseguir la homeostasis de este catión en la planta (Pardo *et al.*, 2006). Estudios recientes en tomate demostraron que SOS1 favorece, en condiciones de alta salinidad, la acumulación de Na<sup>+</sup> en el tallo y evita su acumulación en raíz a salinidad moderada o en las hojas a cualquier concentración de sal (Olías *et al.*, 2009). Estos resultados son coherentes con un modelo en el que SOS1 cargaría Na<sup>+</sup> en el xilema de la raíz,



mientras HKT1;1 lo descargaría en el tallo para evitar su llegada a tejidos fotosintéticos. A su vez, SOS1 excluiría el  $\text{Na}^+$  de las hojas jóvenes hacia el apoplasto para evitar la acumulación de este catión en el citosol de células sin un buen sistema vacuolar, mientras HKT1;1 actuaría descargándolo en hojas completamente expandidas. Conclusiones similares se han alcanzado con el estudio de plantas de *Thelungiella salsuginea* en las que se suprimió la expresión de SOS1 (Oh *et al.*, 2009). En esas plantas se produjo una acumulación preferente de  $\text{Na}^+$  en las células de parénquima del xilema hasta alcanzar una proporción  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  doce veces mayor en las plantas control. Se ha sugerido que esta acumulación indebida de  $\text{Na}^+$  podría interferir con la carga de  $\text{K}^+$  en el xilema para su translocación al tallo, explicando así el fenotipo de falta de crecimiento del mutante *sos1* en bajo  $\text{K}^+$  (Wu *et al.*, 1996) (ver apartado **I.7.3.3.**).

Otra proteína implicada en el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia es el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  CHX21 (Hall *et al.*, 2006). Localizado en la membrana plasmática de células de la endodermis de la raíz, parece contribuir también, al igual que SOS1, a la carga de  $\text{Na}^+$  en el xilema, mostrando un menor contenido de este catión en xilema y parte aérea el mutante *chx21*.



**Figura I.3. Mecanismos de absorción, transporte y distribución de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en las plantas.** Se muestra una representación esquemática de los distintos procesos de transporte de cationes que se dan lugar en la raíz y las hojas. Los círculos azules de bordes negros representan transportadores no identificados.

### **I.7.3.1. SOS1: filogenia y características.**

La familia CPA1 de intercambiadores catión/ $H^+$  muestra dos clados bien diferenciados: el que incluye a NhaP/SOS1 y la subfamilia NHX/NHE (Brett *et al.*, 2005). La subfamilia NhaP/SOS1, presente en bacterias, protozoos y plantas, está formada por proteínas con una región aminoterminal transmembrana seguida por una larga cola carboxiterminal hidrofílica (Pardo *et al.*, 2006). A diferencia de las proteínas NHX, de localización vacuolar, la proteína SOS1 se localiza en la membrana plasmática, donde funciona como intercambiador  $Na^+/H^+$  electroneutro (Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002). Se ha clonado un homólogo de SOS1 en *Physcomitrella patens* y dos en *Cymodocea nodosa* (Benito y Rodríguez-Navarro, 2003; Garcíadeblás *et al.*, 2007). También se han identificado los homólogos de SOS1 en los genomas de arroz (Martínez-Atienza *et al.*, 2007a), *Populus euphratica* (Wu *et al.*, 2007), trigo blando (Xu *et al.*, 2008), tomate (Olías *et al.*, 2009) *Thellungiella salsuginea* (Oh *et al.*, 2009), trigo duro (Feki *et al.*, 2011) y *Chrysanthemum crassum* (Song *et al.*, 2012). En el genoma de Arabidopsis se identificó el gen *NHX8* (locus At1g14660), que muestra una identidad del 72% con SOS1, si bien la proteína que codifica presenta un extremo carboxiterminal 400 aminoácidos más corto que el de ésta. Ensayos con el mutante *nhx8* demostraron que esta proteína es un antiportador  $Li^+/H^+$  que no transporta otros cationes monovalentes como  $Na^+$ ,  $K^+$  o  $Cs^+$ . Se localiza en la membrana plasmática y se expresa principalmente en el tejido vascular de las hojas y en los pelos radicales, siendo su expresión constitutiva y no inducida por estrés, ni siquiera por altas concentraciones de  $Li^+$  (An *et al.*, 2007).

Los mutantes *sos1* (Salt Overly Sensitive 1) se identificaron en un rastreo de semillas mutagenizadas con etilmetanosulfonato (EMS) por mostrar hipersensibilidad a  $Na^+$ . También se observó sensibilidad a  $Li^+$  y bajo crecimiento en medios pobres en  $K^+$  (Wu *et al.*, 1996). Un análisis de la secuencia de SOS1 mostró que codificaba una proteína de 127 kDa con 12 dominios transmembrana en el extremo aminoterminal y una larga cola hidrofílica en el carboxiterminal, localizada en el citoplasma. La búsqueda en bases de datos reveló grandes similitudes con antiportadores  $Na^+/H^+$  animales y microbianos (Shi *et al.*, 2000). Ensayos de transporte confirmaron que se trata de un antiportador  $Na^+/H^+$  electroneutro, con poca afinidad por otros cationes monovalentes como  $Li^+$  o  $K^+$  (Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2003).

### **I.7.3.2. Regulación del sistema SOS.**

La actividad intercambiadora  $Na^+/H^+$  se detectó en vesículas de membrana plasmática pertenecientes a plantas de Arabidopsis tratadas con sal pero no en las control, indicando que la actividad de SOS1 se induce por estrés salino (Qiu *et al.*, 2002). La activación de SOS1 se produce a dos niveles: estabilización de su mRNA y activación directa de la tasa de intercambio iónico (Halfter *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2002, Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2008)

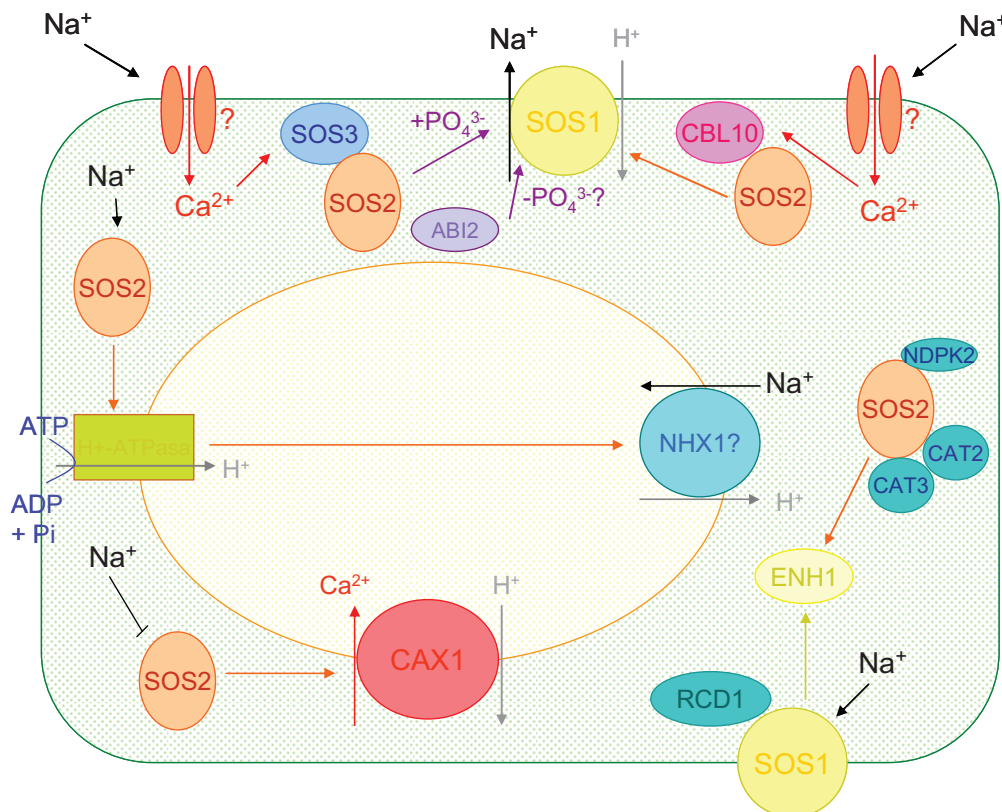
El nivel de transcrito de *SOS1* se induce por estrés salino, en un mecanismo parcialmente dependiente de *SOS2* y *SOS3* (Shi *et al.*, 2003). La sobreexpresión de *SOS1* en plantas silvestres incrementó la tolerancia de éstas a salinidad (Shi *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009) pero sólo se vio una mayor acumulación de transcrito en presencia de sal, indicando que el mRNA de *SOS1* es inestable en condiciones normales y el tratamiento salino induce una estabilización post-transcripcional. La acumulación del transcrito es rápida y dependiente de la concentración de NaCl. Análisis por Northern-blot en plantas transgénicas sobreexpresando *SOS1* sometidas a distintos estreses revelaron que la acumulación del transcrito de *SOS1* también se induce por tratamientos con KCl, LiCl y deshidratación, ligeramente por ABA y sorbitol y nada por estrés frío (Chung *et al.*, 2008). Interesantemente, el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también aumentó la estabilidad del mRNA. El pretratamiento con DMTV y DF (degradan ROS) o con DPI (inhibe la NADPH oxidasa, que produce ROS extracelulares) redujeron la estabilización del mRNA de *SOS1* durante el tratamiento salino, indicando que las ROS producidas como consecuencia del estrés salino se encargan de estabilizar el transcrito de *SOS1* (Chung *et al.*, 2008).

La regulación de la actividad antiportadora de *SOS1* se lleva a cabo a través del complejo formado por la proteína quinasa *SOS2* (CIPK24) y el sensor de Ca<sup>2+</sup> *SOS3* (CBL4) (Qiu *et al.*, 2002). Plantas de *Arabidopsis* mutantes para cualquiera de las dos proteínas muestran los fenotipos de hipersensibilidad en medios ricos en Na<sup>+</sup> o pobres en K<sup>+</sup> similares a los de los mutantes *sos1*, indicando su participación en una ruta común (Zhu, 2000). El análisis de la secuencia de *SOS2/CIPK24* reveló que codificaba una proteína-quinasa de serina y treonina de 51 kDa. El dominio quinasa se encuentra en el extremo aminoterminal y muestra gran similitud con el de la quinasa SNF1 de levadura y con las kinasas dependientes de cAMP de mamíferos (Liu *et al.*, 2000). En condiciones normales, el dominio aminoterminal se encuentra bloqueado mediante su unión al dominio regulador carboxiterminal. El estrés salino provoca incrementos transitorios en los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólicos, que son percibidos por *SOS3*. Sólo en presencia de Ca<sup>2+</sup>, *SOS3* se une a la secuencia de 21 aminoácidos del extremo carboxiterminal de *SOS2* conocida como dominio FISL para dirigirlo a la membrana plasmática y liberarlo de su autoinhibición, permitiéndole activar a *SOS1* (Halfter *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2002, Quintero *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2004). La activación de *SOS1* por *SOS2* se produce a través de la fosforilación de la serina que ocupa la posición 1138, siendo también necesaria la presencia de la serina en la posición 1136, que podría ser también fosforilada o solamente necesaria para el reconocimiento de *SOS1* como sustrato de la quinasa *SOS2*. El extremo carboxiterminal de *SOS1* (desde la posición 998 hasta el final) es un dominio autoinhibitorio. Su delección produce una proteína hiperactiva y constitutivamente activa, independientemente de su interacción con el complejo *SOS2/SOS3*, en levadura. Junto a esta región, en las posiciones 742-998, existe un dominio similar a los de unión a nucleótidos cíclicos. Estudios en levadura sugieren que la interacción de este dominio con el extremo carboxiterminal mantiene a *SOS1* en un estado basal inactivo, del que se libera mediante la fosforilación por *SOS2* (Quintero *et al.*, 2011). *SOS2* se puede convertir en una quinasa

constitutivamente activa mediante la delección de su extremo carboxiterminal o mutagenizando la treonina que ocupa la posición 168 a ácido aspártico, siendo ambos efectos aditivos (Guo *et al.*, 2001, 2004). También la serina de la posición 223, que constituye un punto de autofosforilación, es importante en la tolerancia a salinidad conferida por SOS2 (Fuji y Zhu, 2009). Entre los aminoácidos 333 y 369 de SOS2 del extremo carboxiterminal de SOS2 se encuentra el dominio PPI de unión a fosfatasa. En ensayos de doble híbrido se vio que SOS2 es capaz de interactuar con la fosfatasa ABI2 a no ser que se muten la arginina en la posición 340 y/o la fenilalanina en la posición 341, que se encuentran muy conservadas en los dominios PPI de las CIPKs. Puesto que ni SOS2 es capaz de fosforilar a ABI2 ni ésta puede desfosforilar a SOS2 y el dominio PPI se encuentra muy cerca del dominio FISL, se cree que SOS3 podría regular a ambas proteínas, de función opuesta, para coordinar la fosforilación y desfosforilación de los mismos sustratos (Ohta *et al.*, 2003). Otra diana de SOS2 es el antiportador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  tonoplástico CAX1, que es activado por esta kinasa. Los genes CAX se clonaron inicialmente por su habilidad para suprimir el fenotipo de hipersensibilidad a niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  en un mutante de levadura (Hirschi *et al.*, 1996). Ensayos con distintos mutantes de ambas proteínas revelaron que la interacción es a través del dominio aminoterminal de CAX1 y es independiente de la función kinasa y el dominio FISL de SOS2 (Cheng *et al.*, 2004). SOS2 debe ser llevada al tonoplasto para, mediante la activación de CAX1, favorecer la compartimentación de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que probablemente se lleve a cabo mediante su interacción con una CBL distinta de SOS3. Este mecanismo debe ser inhibido en presencia de altas concentraciones de  $\text{Na}^{+}$ , ya que las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  son necesarias para que SOS3 active la ruta SOS en presencia de estrés salino. Finalmente, SOS2 también mejora la tolerancia a salinidad actuando a través de la compartimentación de  $\text{Na}^{+}$  en la vacuola promoviendo la actividad intercambiadora  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  en el tonoplasto, lo que probablemente sea indirecto y causado por su interacción con la  $\text{H}^{+}$ -ATPasa vacuolar, a la que activa mediante su unión a la subunidad VHA-B (Qiu *et al.*, 2004; Batelli *et al.*, 2007).

El gen *SOS3/CBL4* codifica una proteína con 4 dominios del tipo “*EF-hand*” de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  similares a la subunidad B de la calcineurina y a los sensores neuronales de  $\text{Ca}^{2+}$  en animales (Liu *et al.*, 2000). La unión de ácido mirístico a la glicina que ocupa la segunda posición en el extremo aminoterminal es necesaria para la funcionalidad de SOS3 *in planta* y para el correcto posicionamiento del complejo SOS2/SOS3 en la membrana plasmática (Ishitani *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2006). El mutante *sos3-1* se aisló, en un rastreo de semillas mutagenizadas con neutrones rápidos, por su sensibilidad a NaCl en el medio. Las plantas mutantes también presentaban déficit de crecimiento en medios bajos en  $\text{K}^{+}$  y ambos fenotipos podían ser aliviados aumentando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Liu y Zhu, 1998). Posteriormente se descubrió que la mutación consiste en una delección de tres aminoácidos conservados en el dominio central “*EF-hand*” de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que reduce sustancialmente su capacidad de unión a este catión (Liu y Zhu, 1998; Ishitani *et al.*, 2000). La obtención de la estructura cristalina de SOS3 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2005) reveló que, tras la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , la proteína SOS3 forma un dímero que refuerza su carácter hidrofóbico y expone los sitios de unión a

metales, la zona aminoterminal de miristoilación y el extremo carboxiterminal de interacción con SOS2. Con la determinación de la estructura de la unión del extremo carboxiterminal de SOS2 con SOS3 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2007) se vio que el dominio aminoterminal catalítico de SOS2 y el aminoterminal de SOS3 se sitúan en posiciones opuestas del complejo, reforzando el papel propuesto para SOS3 como puente entre SOS2 y la membrana plasmática. SOS3 sólo se expresa en raíz, mientras que SOS1 y SOS2 son de expresión ubicua. Plantas de *Arabidopsis* mutantes para la proteína CBL10, similar a SOS3 pero de expresión en parte aérea, mostraron sensibilidad a NaCl siendo el efecto aditivo en el doble mutante *sos3 cbl10*. Mediante ensayos de “pull-down”, se comprobó que CBL10 se unía a SOS2 (Quan *et al.*, 2007). La interacción requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y del dominio FISL de SOS2, siendo necesaria la fosforilación por parte de SOS2 de la serina que ocupa la posición 237 en CBL10 para la formación del complejo y su posicionamiento en la membrana plasmática (Quan *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009). De este modo, la activación de SOS1 en la raíz se realizaría mediante el complejo SOS2/SOS3, mientras que en la parte aérea lo haría SOS2/CBL10. Recientemente se ha descubierto que mediante la interacción con el extremo carboxiterminal de CIPK6, SOS3 favorece la translocación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de AKT2 del retículo endoplasmático a la membrana plasmática, así como su activación en oocitos de *Xenopus*. Los mutantes *sos3*, *cipk6* y *akt2* muestran fenotipos similares de retraso en desarrollo y floración (Held *et al.*, 2011).



**Figura I.4. Representación esquemática de los procesos en los que la ruta SOS protege a la célula de los estreses salino y oxidativo.** Ante estrés salino, el complejo activado por  $\text{Ca}^{2+}$  SOS2/SOS3 fosforila a SOS1 para favorecer la expulsión de  $\text{Na}^+$  de la célula. Se cree que la fosfatasa ABI2 es capaz de desfosforilar sustratos de SOS2, como SOS1. CBL10 también forma un complejo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  con SOS2, activando la expulsión de  $\text{Na}^+$  de la célula a través de SOS1. En presencia de  $\text{Na}^+$ , SOS2 también contribuye a crear el gradiente de  $\text{H}^+$  en el tonoplasto

mediante la activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de tipo V. Además, es capaz de activar a CAX1, favoreciendo la compartimentación vacuolar de Ca<sup>2+</sup>. Finalmente, tanto SOS1 como SOS2 participan en la detoxificación del estrés oxidativo. Ambas proteínas potencian la actividad de la proteína cloroplástica similar a rubredoxina ENH1, ya sea mediante la inducción de su expresión durante episodios de estrés salino (SOS1) o mediante la activación de la proteína (SOS2). Además, SOS1 interacciona con el regulador transcripcional de genes de respuesta a estrés oxidativo RCD1, mientras SOS2 lo hace con proteínas de señalización por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como NDPK2, CAT2 y CAT3. (Adaptado de Mahajan *et al.*, 2008).

### 1.7.3.3. Interacción de la ruta SOS con la nutrición de K<sup>+</sup>.

Con la identificación del locus *AtSOS1* en el primer rastreo de semillas mutagenizadas, se sugirió que participaba en la adquisición de K<sup>+</sup> además de en la tolerancia a salinidad debido a la incapacidad de los mutantes *sos* de crecer en medios con déficit de K<sup>+</sup> (Wu *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998). Sin embargo, los posteriores mapeo de la mutación y análisis de la secuencia del gen demostraron que presentaba gran homología con transportadores de Na<sup>+</sup> (Shi *et al.*, 2000), lo que se confirmó en numerosos ensayos de transporte, en los que mostró alta afinidad por Na<sup>+</sup> y baja por otros cationes monovalentes (Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2003). La expresión heteróloga de SOS1 en levadura fue incapaz de suprimir el defecto de crecimiento de una cepa de mutante para los transportadores TRK1 y TRK2, principales responsables de la adquisición del K<sup>+</sup> externo en este organismo (Quintero *et al.*, 2002) En su supervivencia frente al estrés salino, las plantas necesitan mantener una alta relación K<sup>+</sup>:Na<sup>+</sup> en el citosol de las células y una correcta distribución de Na<sup>+</sup> en la planta. La falta de proteínas SOS funcionales provoca fuertes desequilibrios en la homeostasis sódica, lo que a su vez repercute negativamente en la homeostasis de K<sup>+</sup> (Maathuis y Amtmann, 1999; Tester y Davenport, 2003; Pardo *et al.*, 2006).

La presencia de elevadas concentraciones de Na<sup>+</sup> en la solución del suelo interfiere con la adquisición de K<sup>+</sup> compitiendo con los sitios de unión en los transportadores que permiten la toma de este catión (Hasegawa *et al.*, 2000). Como se ha indicado en el apartado 1.1.7.1.1., la vía que se ha propuesto como más probable para la entrada de Na<sup>+</sup> en la planta son los canales no selectivos de cationes (NSCC), que muestran escasa discriminación entre cationes monovalentes (Amtmann y Sanders, 1999; Tyerman y Skerret, 1999; Zhu, 2003; Rus *et al.*, 2004). En los mutantes *sos*, el fenotipo de sensibilidad a sal es inversamente proporcional a la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la solución salina (Liu *et al.*, 1998). El Ca<sup>2+</sup> activa al complejo SOS2/SOS3 para favorecer la extrusión y el transporte controlado de Na<sup>+</sup>, además de favorecer la toma preferente de K<sup>+</sup> sobre Na<sup>+</sup> mediante la inhibición de los NSCC y de la pérdida de K<sup>+</sup> debida a NaCl (Liu y Zhu, 1997; Davenport y Tester, 2000; Shabala *et al.*, 2006).

La mutación *hkt1;1* se aisló inicialmente en un rastreo de supresores extragenéticos de sensibilidad a Na<sup>+</sup> en el mutante *sos3*. Curiosamente, también suprimió el fenotipo de deficiencia de K<sup>+</sup>, mientras que la sobreexpresión de *HKT1;1* incrementó los síntomas de sensibilidad a Na<sup>+</sup> y deficiencia de K<sup>+</sup>, tanto en *sos3* como en la línea silvestre (Rus *et al.*, 2001, 2004), si bien la caracterización electrofisiológica de la proteína AtHKT1;1 demostró que era un transportador específico para Na<sup>+</sup> (Uozumi *et al.*, 2000). Como se ha detallado en el

apartado I.7.2., el modelo actual establece que la función principal de HKT1 es la descarga de  $\text{Na}^+$  del xilema para controlar el transporte de este catión. Coordinándose con SOS1, regularía la correcta distribución de  $\text{Na}^+$  a lo largo de la planta (Sunarpi *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2006; Davenport *et al.*, 2007; Olías *et al.*, 2009). Las mutaciones *sos* favorecen la sobreacumulación de  $\text{Na}^+$  en la raíz y *hkt1;1* en la parte aérea, impidiendo o favoreciendo respectivamente la toma de  $\text{K}^+$ . En un doble mutante *sos3 hkt1*, en cambio, se obtuvo una distribución de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  más equilibrada y similar a la de la línea silvestre (Rus *et al.*, 2004).

El nivel del transcrito de muchos transportadores de  $\text{K}^+$  se altera en presencia de estrés salino. *AtKC1* en *Arabidopsis* y *KMT1* en *Mesembryanthemum crystallinum* se inducen, mientras que *HAK5* en *Arabidopsis* y *MKT1* en *M. crystallinum* se reprimen (Su *et al.*, 2001, 2002; Pilot *et al.*, 2003; Nieves-Cordones *et al.*, 2010). Se cree que la excesiva acumulación de  $\text{Na}^+$  en las raíces de los mutantes *sos* podría inhibir transportadores de  $\text{K}^+$  responsables de su toma y distribución a larga distancia (Pardo *et al.*, 2006), habiéndose demostrado ya que el canal de entrada de  $\text{K}^+$  AKT1 constituye una diana de toxicidad por  $\text{Na}^+$ . El estrés salino moderado causó una severa inhibición del crecimiento y la permeabilidad a  $\text{K}^+$  en raíces del mutante *sos1* de *Arabidopsis* pero no en la línea silvestre. Además, la adición de una solución de NaCl 10 mM en el citosol de células de raíz de plantas silvestres inhibió las corrientes de entrada de  $\text{K}^+$  en ensayos *patch-clamp* (Qi y Spalding, 2004). A salinidad elevada, incluso se pueden producir pérdidas de  $\text{K}^+$  a través de este canal (Nieves-Cordones *et al.*, 2010). La despolarización de la membrana plasmática debida a la excesiva acumulación de  $\text{Na}^+$  también podría producir la activación anormal de los canales de salida de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje.

En *Thelungiella salsuginea*, el silenciamiento por RNAi del ortólogo de *AtSOS1*, *ThSOS1*, produjo plantas hipersensibles a  $\text{Na}^+$  que mostraban una acumulación más rápida de este catión, mayor pérdida de agua en parte aérea ante estrés salino y eliminación más lenta del exceso de  $\text{Na}^+$  de la raíz después de finalizar el tratamiento salino que la línea silvestre. El uso del tinte específico para  $\text{Na}^+$  "CoroNa-Green" demostró que en las líneas *thsos1* aumentaba el contenido de este catión en el ápice radical, llegando a acumularse a largo plazo en la estela y formar una barrera sódica. La mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  en la estela produjo un incremento en la muerte celular, determinado mediante la tinción con yoduro de propidio. La medida de los contenidos iónicos por SEM-EDX demostró que la falta de un antiportador *ThSOS1* funcional interfería con la carga de  $\text{K}^+$  en el xilema, siendo el contenido de este catión 12 veces menor en el parénquima del xilema en raíces de la línea *thsos1* que en las de la silvestre. Esta menor carga en el xilema no se tradujo en una menor acumulación de este catión en la parte aérea, sino que los contenidos de  $\text{K}^+$  fueron ligeramente mayores en la línea mutante para todos los tipos celulares analizados. Sin embargo, debido a la mayor toma de  $\text{Na}^+$ , los cocientes  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  fueron también mayores en la línea *thsos1* que en la silvestre. (Oh *et al.*, 2009).

Finalmente, la ruta SOS podría controlar la nutrición de  $\text{K}^+$  de forma indirecta, a través de la regulación de la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática (Shabala *et al.*, 2005). Plantas mutantes *sos1*, *sos2* y *sos3* mostraron, en ausencia de estrés salino, menor flujo de  $\text{H}^+$  que la



línea silvestre. El potencial de membrana no se vio afectado excepto en el ápice radical, donde resultó inferior en el mutante *sos1* que en la línea silvestre. Estos datos sugieren que SOS1 activaría el bombeo de H<sup>+</sup> a través de la H<sup>+</sup>-ATPasa, lo que favorecería la toma de K<sup>+</sup>.

#### 1.7.3.4. Sobreexpresión de SOS1 y mejora de la tolerancia a salinidad.

En mejora genética de la halotolerancia, se ha utilizado mucho la sobreexpresión de genes inducidos por estrés y/o requeridos para la tolerancia. Las proteínas LEA (del inglés, *Late Embryogenesis Abundant*) se acumulan durante la formación de las semillas. La sobreexpresión de *HVA1* de cebada y *DHN-5* de trigo mejoró la halotolerancia de plantas de arroz y *Arabidopsis* respectivamente (Xu *et al.*, 1996; Brini *et al.*, 2007), si bien se desconoce su modo de acción. El estrés osmótico induce también la acumulación de osmolitos, con función osmoprotectora, y en la degradación de ROS. Por ingeniería genética se han desarrollado plantas con mejor tolerancia a salinidad mediante la sobreexpresión de manitol (Tarczynski *et al.*, 1992), prolina (Kishor *et al.*, 1995), ononitol (Sheveleva *et al.*, 1997), glicinbetaína (Holmstrom *et al.*, 2000), trehalosa (Garg *et al.*, 2002), fructano (Pilon-Smits *et al.*, 1995), ectoína (Nakayama *et al.*, 2000) o sorbitol (Gao *et al.*, 2001). También se ha conseguido una mayor halotolerancia mediante la sobreexpresión de genes reguladores de rutas de señalización como factores de transcripción DREB/CBF (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999) y kinasas MAPK o CDPK (Kovtun *et al.*, 2000; Saijo *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003; Teige *et al.*, 2004). Otra estrategia utilizada ha sido la manipulación de enzimas implicadas en protección frente a estrés oxidativo como glutatión-S-transferasa, peroxidasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasas (Gupta *et al.*, 1993; Roxas *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2007b).

En cambio, los intentos de mejorar la halotolerancia de las plantas mediante proteínas que mantienen su homeostasis iónica han sido más escasos. La expresión ectópica de *HAL1* y calcineurina resultaron en la obtención de plantas de tomate y tabaco halotolerantes (Pardo *et al.*, 1998; Gisbert *et al.*, 2000). Adicionalmente, la sobreexpresión del antiportador catión/H<sup>+</sup> vacuolar *AtNHX1* o la H<sup>+</sup>-pirofosfatasa *AVP1* demostraron mejorar la tolerancia de *Arabidopsis* (Aspe *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 2001) y tomate (Zhang *et al.*, 2001) frente a estrés salino, si bien algunos de estos resultados no se han reproducido en ensayos similares en nuestro laboratorio (Leidi *et al.*, 2009; Barragán *et al.*, 2012).

La sobreexpresión de *SOS1* controlada por el promotor CaMV35S, considerado a menudo de expresión constitutiva pero con expresión preferente en el parénquima del xilema, mejoró en *Arabidopsis* la tolerancia a salinidad en distintos ensayos realizados en callos, semillas en germinación, plántulas y plantas adultas. Las plantas mostraron mayor inducción del transcrito de *SOS1* en presencia de estrés salino y menor acumulación de Na<sup>+</sup> en parte aérea y savia del xilema. (Shi *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009).

### I.7.3.5. Ruta SOS y estrés oxidativo.

El análisis de la secuencia de *SOS1* predijo que codificaba una proteína de 127 kDa, con 12 dominios transmembrana y una larga cola hidrofílica en el extremo carboxiterminal, situada presumiblemente en el citosol (Shi *et al.*, 2000). Se ha sugerido que esta cola podría actuar como sensor de  $\text{Na}^+$  (Zhu *et al.*, 2002) o que podría interactuar con proteínas reguladoras como sucede en otros transportadores (Putney *et al.*, 2002). Ya se ha demostrado que *SOS1*, cuyo mRNA se estabiliza en presencia de estrés salino mediante la acción de ROS, tiene cierto papel en la tolerancia a estrés oxidativo mediante la interacción de su extremo carboxiterminal con el regulador transcripcional de genes de respuesta a estrés oxidativo *RCD1* (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2008). El gen *RCD1* (*Radical-induced Cell Death 1*) se identificó primero por su habilidad para complementar la sensibilidad a ROS en levadura (Belles-Boix *et al.*, 2000). Rastros posteriores en planta buscando mutantes sensibles a  $\text{O}_3$  y resistentes a metil viológeno llevaron al aislamiento de las líneas *rcd1-1* y *rcd1-2* (Overmyer *et al.*, 2000; Fujibe *et al.*, 2004). Un análisis de su secuencia reveló que la proteína *RCD1* presentaba dos dominios muy conservados: el globular de interacción proteína-proteína WWE en su extremo aminoterminal y el catalítico de poli(ADP-ribosa) polimerasa, que podría estar implicado en reacciones de modificación de proteínas (Ahlfors *et al.*, 2004). Posteriormente se descubrió que contenía el dominio RST, también presente en el componente del complejo de iniciación de la transcripción TAF4 (Jaspers *et al.*, 2010). El extremo carboxiterminal de *SOS1* es capaz de interactuar con *RCD1*, participando en la tolerancia de las plantas a estrés oxidativo. *RCD1* también juega un papel en la tolerancia a estrés salino, si bien cumple esta función independientemente de *SOS1* (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). El mutante *sos1-1* comparte con *rcd1-1* su extrema halosensibilidad, así como su sensibilidad a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y resistencia a metil viológeno (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). *SOS1* interviene también en la detoxificación del estrés oxidativo induciendo la expresión de *ENH1* en el cloroplasto durante estrés salino (Zhu *et al.*, 2007), mientras que *SOS2*, además de activar a esta proteína cloroplástica, interacciona con *NDPK2*, *CAT2* y *CAT3*, para regular la señalización por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Verslues *et al.*, 2007).



## II. OBJETIVOS.

1. Caracterización *in planta* de candidatos a alelos hiperactivos de *SOS1* aislados en levadura mediante la obtención de plantas transgénicas sobreexpresando dichos alelos.
2. Aislamiento de nuevos alelos hiperactivos de *SOS1* mediante la realización de un rastreo de semillas transgénicas de *Arabidopsis*.
3. Profundización en el conocimiento de la implicación del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  *SOS1* en la adquisición de  $\text{K}^+$  por la planta.
4. Estudio de posibles funciones de *SOS1* independientes de su papel en la homeostasis iónica mediante la caracterización de un alelo mutado en un residuo muy conservado en transportadores de  $\text{Na}^+$ .



### III. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### M.1. Material biológico.

##### M.1.1. Bacterias.

##### M.1.1.1. Cepas de bacterias utilizadas.

##### *Escherichia coli*.

Para la propagación de plásmidos se emplearon las cepas:

Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
XL1- Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46t hi relA1 lac<sup>-</sup> F' [proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet<sup>r</sup>)]</i>	Bullock et al. (1987)
XL10 Gold	<i>TetR Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup> ZΔDM15 Tn10 (TetR) Amy Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene, La Jolla (CA)
TOP10	<i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔlacX74, deoR, recA1, araD139Δ(ara-leu)7697, galK, rpsL, endA1, nupG</i>	Invitrogen
DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Taylor et al. (1993)

La mutagénesis *in vivo* de plásmidos se llevó a cabo mediante su propagación en la cepa XL1-Red.

Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
XL1- Red	<i>endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 relA1 lac glnV44 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) mutS mutT mutD5 Tn10</i>	Stratagene, La Jolla (CA)

##### *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la transformación de primordios seminales de *Arabidopsis thaliana*, se empleó la cepa GV3101, portadora de los genes *vir* en el plásmido pMP90.

Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
GV3101	C58 RifR::pMP90	Koncz y Shell, 1986

#### M.1.1.2. Medios y condiciones de crecimiento.

Todos los medios se esterilizaron mediante su autoclavado durante 20 minutos a 120 °C y 2 atmósferas de presión. Los medios sólidos se conservaron a 4 °C durante un máximo de dos meses, mientras que los líquidos se mantuvieron a temperatura ambiente.

#### Medio Lysogenic Broth (LB)

Extracto de levadura	0.5% (p/v)
Bacto-triptona	1% (p/v)
NaCl o KCl	1% (p/v)

Para preparar medio LB sólido se añadieron 15 g/l de Bacto-agar (Difco). La selección de plásmidos en cepas bacterianas se llevó a cabo añadiendo a los medios enfriados a ~50 °C antibióticos esterilizados por filtración (0.22 µm)

Para preparar células competentes de *E. coli*, las bacterias crecieron en **medio Φ**

#### Medio Φ

Extracto de levadura	0.5% (p/v)
Bacto-triptona	2% (p/v)
MgSO <sub>4</sub>	15 mM
KCl	10 mM

Para recuperar las células de *E. coli* después de un protocolo de transformación, se utilizó el medio SOC

### Medio SOC

Bacto-triptona	2% (p/v)
Extracto de levadura	0.5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucosa	20 mM

Para preparar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*, las bacterias se incubaron en **medio YEP**.

### Medio YEP

Bacto-peptona	1% (p/v)
Extracto de levadura	1% (p/v)
NaCl	0.5% (p/v)

### Preparación de los distintos antibióticos.

**Ampicilina:** se preparó una solución stock a una concentración de 100 mg/ml en agua de calidad milli-Q. Esta solución se esterilizó utilizando filtros de 0.22 µM (Millipore Corp., Bedford, Massachussets, EEUU). Se suplementaron los medios de cultivo añadiendo 1 µl de esta solución a cada ml de medio, de forma que la concentración final de ampicilina fue de 100 µg/ml.

**Espectinomicina:** se preparó una solución stock a una concentración de 100 mg/ml en agua de calidad milli-Q. Esta solución se esterilizó utilizando filtros de 0.22 µM (Millipore Corp., Bedford, Massachussets, EEUU). Se suplementaron los medios de cultivo añadiendo 0.5 µl de esta solución a cada ml de medio para *E. coli* o 1 µl de la solución a cada ml de medio para *A. tumefaciens*.

**Gentamicina:** se preparó una solución stock a una concentración de 20 mg/ml en agua de calidad milli-Q. Esta solución se esterilizó utilizando filtros de 0.22 µM (Millipore Corp.,



Bedford, Massachussets, EEUU). Se suplementaron los medios de cultivo añadiendo 1  $\mu$ l de esta solución a cada ml de medio, de forma que la concentración final de gentamicina fue de 20  $\mu$ g/ml.

**Higromicina:** se preparó una solución stock a una concentración de 20 mg/ml en agua de calidad milli-Q. Esta solución se esterilizó utilizando filtros de 0.22  $\mu$ M (Millipore Corp., Bedford, Massachussets, EE. UU.). Se suplementaron los medios de cultivo añadiendo 1.25  $\mu$ l de esta solución a cada ml de medio, de forma que la concentración final de higromicina fue de 25  $\mu$ g/ml.

**Kanamicina:** se preparó una solución stock a una concentración de 50 mg/ml en agua de calidad milli-Q. Esta solución se esterilizó utilizando filtros de 0.22  $\mu$ M (Millipore Corp., Bedford, Massachussets, EEUU). Se suplementaron los medios de cultivo añadiendo 1  $\mu$ l de esta solución a cada ml de medio, de forma que la concentración final de kanamicina fue de 50  $\mu$ g/ml.

**Rifampicina:** se utilizó a una concentración de 50  $\mu$ g/ml en cultivos de *A. tumefaciens* para evitar contaminaciones de *E. coli*. Para su preparación, se disolvió el antibiótico en metanol a una concentración de 30 mg/ml. El antibiótico es fotosensible, por lo que se conservó en tubos de propileno estériles y protegidos de la luz.

**Tetraciclina:** se disolvió el antibiótico en etanol absoluto a una concentración de 10 mg/ml y se conservó en tubos Eppendorf estériles y protegidos de la luz. Se suplementaron los medios de cultivo añadiendo 1  $\mu$ l de esta solución a cada ml de medio, de forma que la concentración final de tetraciclina fue de 10  $\mu$ g/ml.

Las cepas de *E. coli* se incubaron durante 24 h a 37 °C, mientras que las *A. tumefaciens* se incubaron a 28 °C durante 48 h. Las bacterias conteniendo los plásmidos de interés se conservaron añadiendo al cultivo glicerol estéril a una concentración final del 15% y se guardaron a -70 °C.

## **M.1.2. Levaduras.**

### **M.1.2.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.**

**S. cerevisiae AXT3K** ( $\Delta$ ena1::HIS3::ena4,  $\Delta$ nha1::LEU2,  $\Delta$ nhx1::KanMX4; Quintero *et al.*, 2002). Deriva de la estirpe silvestre W3031B (MAT $\alpha$  ura3-1 leu2-3, 112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100). Carece de los principales transportadores de Na<sup>+</sup> necesarios para su tolerancia salina: las ATPasas de Na<sup>+</sup> ENA1-4, el antiportador Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHA1 de la membrana plasmática (Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995; Bañuelos *et al.*, 1998), y el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHX1 situado en endosomas (Nass *et al.*, 1997; Darley *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2000). Su fenotipo es de halosensibilidad severa, por lo que ha sido de gran utilidad para la caracterización funcional de transportadores de Na<sup>+</sup> procedentes de plantas (Dreyer *et al.*, 1999).

### M.1.2.2. Medios y condiciones de crecimiento de levaduras.

Se siguieron las técnicas de manipulación y crecimiento de levaduras descritas por Guthrie y Fink (1991) y Ausubel *et al.* (1996). Se incubaron a 30 °C, salvo excepciones indicadas en cada caso, utilizándose para su crecimiento rutinario medio **YPD**.

#### Medio YPD

Extracto de levadura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Glucosa	2% (p/v)

El medio se solidificó añadiendo 2% (p/v) de Bacto-agar (Difco). Para el cultivo de levaduras en medio selectivo, se utilizó el medio mínimo **YNB**.

#### Medio YNB

<i>Yeast Nitrogen Base</i> sin aminoácidos	0.17% (p/v)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5% (p/v)
Glucosa	2% (p/v)

El medio se suplementó con los aminoácidos y bases nitrogenadas necesarios para cada cepa a las concentraciones indicadas por Ausubel *et al.* (1996) y se ajustó el pH a 6.0 con KOH.

Para realizar los ensayos de tolerancia a Na<sup>+</sup> se utilizó el medio libre de cationes alcalinos **AP**, descrito por Rodríguez-Navarro y Ramos (1984).

#### Medio AP

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.2 mM
Arginina	10 mM
Glucosa	2%

Este medio se suplementó con soluciones de **vitaminas** y **oligoelementos** a las concentraciones que se indican a continuación.

### Solución de vitaminas.

Biotina	20 g/l
Niacina	0.4 mg/l
Piridoxina	0.4 mg/l
Tiamina	0.4 mg/l
Ácido pantoténico	0.4 mg/l

### Solución de oligoelementos.

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.5 mg/l
CuSO <sub>4</sub>	0.04 mg/l
KI	0.1 mg/l
FeCl <sub>3</sub>	0.2 mg/l
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.4 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04 mg/l

Para realizar ensayos de tolerancia a salinidad, se añadió 1 mM de KCl y se suplementó con la concentración indicada de NaCl, así como con los aminoácidos y bases nitrogenadas necesarios para cada cepa. Para conservar cepas de interés, se añadió al cultivo glicerol estéril a una concentración final del 15% y se guardaron a -70 °C.

### M.1.3. *Arabidopsis thaliana*.

#### M.1.3.1. Líneas utilizadas.

Se utilizaron las siguientes líneas de *Arabidopsis*.

Ecotipo	Líneas	Procedencia
Columbia	Col-0 <i>gl1</i>	<i>Arabidopsis</i> Biological Resource Center (ABRC, Ohio State University, Ohio, EE.UU)
Columbia	<i>sos1-1</i>	Laboratorio de Jian-Kang Zhu (Universidad de California, Riverside)
Columbia	NASC_N571803 ( <i>akt1-2</i> )	Laboratorio de Francisco Rubio (Centro de Biología y Edafología Aplicada del Segura, Murcia).

#### M.1.3.2. Cultivo de plantas en suelo.

##### Condiciones de cultivo.

Las semillas de *Arabidopsis* se sometieron a vernalización durante 2 días a 4 °C, en ausencia de luz y sumergidas en una solución de agar 0.2% (p/v) antes de sembrarlas en

macetas con turba (sustrato tipo 2, Florasca) autoclavada. Las plantas se incubaron en el invernadero en condiciones de iluminación y temperatura controladas: (día/noche): 25/20±2 °C; 40/60% RH (humedad relativa); 16 horas de luz; 150  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  PAR (radiación fotosintéticamente activa). Se mantuvo un régimen de riego de 2-3 veces por semana.

### Recolección y conservación de semillas.

Las plantas se protegieron con Aracons<sup>TM</sup> (Lehle Seeds, Round Rocks, TX, EEUU) tras la aparición del escapo floral. Cuando las silicuas maduraron, se pasaron dos veces por un tamiz de acero inoxidable y se guardaron en sobres de papel, que se conservaron a 4 °C en botes herméticos conteniendo gel de sílice.

#### M.1.3.3. Cultivo de plantas *in vitro*.

### Esterilización de semillas.

Las semillas, una vez desecadas, se añadieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se lavaron con una solución de etanol al 70% durante 2 minutos. A continuación se trataron con una solución de lejía comercial al 50% y TWEEN-20 al 2% durante 7 minutos. Finalmente, se realizaron 4 lavados sucesivos con agua destilada estéril. Tras retirarse el agua del último lavado, se añadió 1 ml de una solución 0.2% (p/v) de agar y se sometieron a vernalización (2 días a 4 °C).

### Medios de cultivo.

Se utilizó una mezcla comercial de **medio MS** (Duchefa), consistente en el medio descrito por Murashige y Skoog (1962) suplementado con la mezcla vitamínica de Gamborg *et al.* (1968).

Macronutrientes (mM)		Micronutrientes ( $\mu\text{M}$ )	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20.6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100
KNO <sub>3</sub>	18.5	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.0	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	100
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.5	EDTA-Na <sub>2</sub>	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30
		KI	5
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1
		CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1

Este medio se suplementó con 30 g/l de sacarosa. El pH se ajustó a 5.7 con KOH y se tamponó con 2.5 mM de MES. Se solidificó añadiendo 10 g/l de Bacto-agar (Difco).

Para la selección de plantas transgénicas se añadió al medio, esterilizado y enfriado a ~50 °C, kanamicina o higromicina en una concentración final de 50 o 25 µg/l respectivamente. Para los ensayos de tolerancia a salinidad, el medio se preparó añadiendo NaCl o LiCl en las concentraciones indicadas.

Las semillas se tomaron directamente con una punta de pipeta de 1000 µl y se distribuyeron separadamente sobre la superficie del medio sólido. Las placas se incubaron en cámaras de cultivo con iluminación y temperatura controladas: (día/noche): 25/20±2 °C; 40/60% RH (humedad relativa); 16 horas de luz; 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR (radiación fotosintéticamente activa).

#### **M.1.3.4. Cultivo de plantas en medio líquido.**

Se preparó medio MS, se ajustó el pH a 5.7 con KOH y se tamponó con 2.5 mM de MES. El medio se preparó añadiendo NaCl o LiCl en las concentraciones indicadas para los ensayos de tolerancia a salinidad. Se tomaron matraces erlenmeyer estériles de 250 ml y en cada uno se añadieron 50 ml de este medio. En cada matraz se depositaron 20 plántulas utilizando pinzas esterilizadas por calor. Los matraces se incubaron en agitación (80 rpm) en las mismas condiciones de iluminación y temperatura que las placas de cultivo *in vitro*.

#### **M.1.3.5. Cultivo de plantas en hidropónico.**

Las semillas, tras someterse a vernalización, se sembraron en tubos Eppendorf con la base recortada y rellenos de lana de roca húmeda. Los tubos se colocaron en una gradilla, que se depositó durante 1 semana en una bandeja con agua. A continuación fueron transferidos a contenedores con 8 litros de una solución basada en la de Hewitt y Notton (1966) y preparada con agua de calidad Elix.

#### **Solución nutritiva para Arabidopsis.**

Macronutrientes (mM)		Micronutrientes (µM)	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.07

La solución se suplementó con 0.04 g/l de Sequestrene 138-Fe (EDDHA-Fe). Puesto que no contiene Na<sup>+</sup> ni K<sup>+</sup>, las concentraciones deseadas de estos cationes se consiguieron

añadiendo el volumen necesario de soluciones de NaCl 5 M y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M respectivamente. El Li<sup>+</sup>, por su parte, se añadió a partir de una solución de LiCl 6M. Las soluciones se renovaron cada dos semanas. Cada contenedor recibió aireación de forma continua por medio de un tubo conectado a una bomba de aire de acuario (Rena™ Air 300). Los contenedores se mantuvieron en el invernadero, en las mismas condiciones de iluminación y temperatura que las plantas cultivadas en suelo.

## M.2. Purificación y análisis de DNA.

### M.2.1. Purificación de DNA.

#### M.2.1.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico bacteriano.

##### M.2.1.1.1. Minipreparación de DNA plasmídico de *E. coli*.

Se extrajeron los plásmidos de *E. coli* siguiendo el método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989). Se inoculó una colonia en LB líquido suplementado con el antibiótico necesario y se incubó durante toda la noche a 37 °C en agitación. Se recogieron las células por centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto (Biofuge Pico, Heraeus) y se resuspendieron bien en un volumen de **Solución I**. A continuación se añadieron 2 volúmenes de **Solución II** recién preparada y se mezcló con suavidad para no desprender el DNA cromosómico bacteriano. Posteriormente se añadieron 1.5 volúmenes de **Solución III**, la mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos (Biofuge Pico, Heraeus) para desechar el debrís de restos celulares. El DNA contenido en el sobrenadante se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y, tras un lavado con etanol al 70% (v/v), se resuspendió en un volumen adecuado de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA-Na<sub>2</sub> pH 8.0) o agua de calidad milli-Q con una concentración de 20 µg/ml de RNAasa A.

Solución I		Solución II		Solución III	
Glucosa	50 mM	NaOH	0.1 M	Acetato sódico pH 5.2	3 M
Tris-HCl pH 8.0	25 mM	SDS	1% (p/v)		
EDTA-Na <sub>2</sub> pH 8.0	10 mM				

Para secuenciación y otras operaciones que requirieran gran pureza del plásmido, se utilizó el kit *Perfectprep® Plasmid Mini* (Eppendorf.)

##### M.2.1.1.2. Minipreparación de DNA plasmídico de *A. tumefaciens*.

La extracción de plásmidos de *A. tumefaciens* se realizó utilizando el mismo protocolo descrito para *E. coli* pero, antes de la precipitación con etanol absoluto, se añadió 1 volumen

de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), se mezcló con el vórtex y se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm (Biofuge Pico, Heraeus). Posteriormente se tomó la fase superior, se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), se mezcló con el vórtex y se centrifugó nuevamente 5 minutos a 10,000 rpm (Biofuge Pico, Heraeus). El DNA, contenido en la fase superior, se precipitó con etanol-acetato sódico (ver apartado M.2.3) y se amplificó en células de *E. coli*, de donde se extrajo para comprobar la integridad del plásmido.

#### **M.2.1.2. Extracción de DNA de plantas.**

Se siguió el protocolo descrito por Edwards *et al.* (1991). Se tomaron dos hojas de la roseta, se introdujeron en un tubo Eppendorf y se congelaron en nitrógeno líquido. A continuación se trituró cada muestra con un émbolo de plástico hasta convertir el material en un polvo fino y se añadieron 400 µl de **tampón de extracción**, incubándose la muestra 5 minutos a 65 °C. A continuación se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), se mezcló con vórtex y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm (Biofuge Pico Heraeus). La fase superior se precipitó con un volumen de isopropanol, incubándose la mezcla 20 minutos a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 15 minutos a 13,000 rpm (Biofuge Pico Heraeus), se lavó el precipitado de DNA con etanol al 70% (v/v) y se secó al vacío antes de resuspenderlo en solución TE o agua de calidad milli-Q con una concentración de 20 µg/ml de RNAasa A. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

#### **Tampón de extracción.**

d-Sorbitol	140 mM
Tris-HCl pH 8.0	220 mM
EDTA-Na <sub>2</sub> pH 8.0	22 mM
NaCl	800 mM
CTAB	0.8% (p/v)
n-Laurilsarcosina	1% (p/v)

#### **M2.2. Cuantificación del DNA.**

La concentración del DNA en la solución se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer).

#### **M.2.3. Precipitación del DNA.**

Para concentrar el DNA en un volumen menor de TE o agua, se utilizó la precipitación con etanol-acetato de sodio. Se añadieron a la solución 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, incubándose la muestra a 0 °C durante 10-20

minutos. Tras centrifugar durante 10 minutos a 13,000 rpm (Biofuge Pico, Heraeus), se lavó el precipitado con etanol al 70% (v/v), se secó al vacío y se resuspendió en el volumen deseado de TE o agua.

#### **M.2.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

Se realizó según se describe en Sambrook *et al.* (1989). El DNA se analizó en geles horizontales de agarosa (0.4-2%) preparados con **TBE** o **TAE**, añadiendo 0.05 µg/ml de bromuro de etidio para teñir el DNA a la luz UV. El gel se sumergió en el mismo tampón utilizado para su preparación y se aplicó un voltaje de 1-10 V/cm. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con un marcador de peso molecular comercial (1 kb DNA *ladder*, Invitrogen) o con DNA del fago λ digerido con *HindIII*.

TBE 10X		TAE 50X	
Tris Base	108 g/l	Tris Base	242 g/l
Ácido bórico	55 g/l	Ácido acético glacial	5.71% (v/v)
EDTA-Na <sub>2</sub> pH 8.0	10 mM	EDTA-Na <sub>2</sub> pH 8.0	50 mM

#### **M.2.5. Extracción de bandas de DNA en geles de agarosa.**

La banda de interés se recortó del gel de TAE y se purificó utilizando el kit *PerfectPrep. Gel Cleanup* (Eppendorf) siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### **M.2.6. Manipulación enzimática del DNA.**

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

##### **M.2.6.1. Digestión del DNA con enzimas de restricción.**

Las digestiones se realizaron siempre en los tampones y condiciones recomendados por el fabricante. Se prepararon soluciones de DNA a una concentración de hasta 100 ng/µl en un volumen de 20-100 µl y se añadió al menos 1 U de enzima por cada µg de DNA. Cuando hubo que digerir con más de una enzima, tras inactivar la primera enzima utilizada, se precipitó el DNA con etanol-acetato de sodio como se describe en el apartado M.2.3.

##### **M.2.6.2. Desfosforilación de los extremos 5' del DNA.**

Mediante este procedimiento se eliminaron los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos utilizados como vectores de clonación, con el fin de evitar su religación. Se añadieron 1-2 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIPasa, Roche) y se incubó la



mezcla a 37 °C durante 15 minutos. La fosfatasa alcalina se inactivó añadiendo 4 µl de EDTA y 10 µl de SDS 10%, llevando el volumen a 100 µl con agua milli-Q y realizando una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) seguida de una precipitación con etanol-acetato de sodio (ver apartado M.2.3).

#### **M.2.6.3. Generación de extremos romos del DNA.**

Este procedimiento permite la ligación de fragmentos de DNA producidos con distintas enzimas que generan extremos incompatibles. Para convertir en romos extremos protuberantes en 5', se rellenó con la enzima Klenow (Sambrook *et al.*, 1989). Para los extremos protuberantes en 3', se usó la DNA polimerasa del bacteriófago T4, que presenta una fuerte actividad exonucleasa 3'→5' sobre el DNA monocatenario (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **M.2.6.4. Ligación de fragmentos de DNA.**

Se preparó una mezcla de reacción con 1 U de DNA ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen), el tampón suministrado por el fabricante en la cantidad recomendada y los fragmentos de DNA que se deseaban ligar, en un volumen máximo de 20 µl. Las cantidades de inserto y vector se calcularon utilizando la fórmula:

$$\frac{50\text{ng de plásmido} \times \text{longitud del inserto (Kb)}}{\text{longitud del plásmido (Kb)}} \cdot \frac{2}{1} = \text{ng de inserto}$$

Siendo 2:1 la relación molar de inserto respecto a vector. Las ligaciones se incubaron a 16 °C durante un mínimo de 5 horas y posteriormente se transformaron células competentes de *E. coli* con 10 µl de la mezcla de reacción. En el caso de realizar la ligación directa de productos de PCR procedentes de amplificación con *Pfu*, se utilizó el *Blunt*®PCR Cloning Kit, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante para su clonado en el vector *Blunt*®PCR.

#### **M.2.6.5. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR con Taq polimerasa.**

Para cada reacción se utilizaron ~100 ng de DNA, 0.25 µM de cada cebador, 2 mM dNTPS (dATP + dCTP + dGTP + dTTP, Boehringer Mannheim), 2.5 o 5 µl de buffer de Taq (Sambrook *et al.*, 1989) y 0.5-1 U de Taq DNA polimerasa en un volumen final de 25 o 50 µl. En general, se utilizaron las siguientes condiciones de reacción: 5 minutos a 95 °C para desnaturalizar el DNA, 25-35 ciclos con la secuencia: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50-65 °C (5 °C por debajo de la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos usados) y 1-3 minutos (1 minuto por

cada kilobase del fragmento amplificado) a 72 °C, para la síntesis del DNA, y finalmente 5 minutos a 72 °C.

#### **Buffer de Taq**

KCl	50 mM
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Gelatina	0.01% (p/v)

#### **M.2.6.6. PCR con DNA polimerasa de alta fidelidad.**

La DNA polimerasa *Pfu* (Stratagene) es una enzima de alta fidelidad que presenta una tasa de error muy baja ( $1,3 \times 10^{-6}$  mutaciones/pb/duplicación), lo que la convierte en idónea para el clonado de productos de PCR. Las reacciones de PCR se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **M.2.6.7. Mutagénesis dirigida mediante PCR.**

Se empleó la polimerasa de *Pfu*, tal y como se indica en el apartado anterior. Esta polimerasa tiene una tasa de error muy baja debido a su capacidad de corrección de errores durante la replicación. Para facilitar la unión con el molde de los oligonucleótidos diseñados, se tuvo la precaución de flanquear la mutación a ambos lados con al menos 15 nucleótidos que hibridaban completamente con la secuencia original. El producto de PCR se clonó directamente con el sistema de clonación comercial *Zero Blunt*<sup>®</sup> *PCR Cloning Kit* (Invitrogen).

#### **M.2.7. Mutagénesis aleatoria de plásmidos *in vivo*.**

Para la obtención de genotecas de cDNA portadores de mutaciones puntuales al azar, se utilizó la estirpe de *E. coli* XL1-Red (Agilent Technologies Inc.). Esta cepa es deficiente en tres de las principales vías de reparación de daños ocurridos durante la replicación del DNA por contener tres mutaciones: *mutS* (propensa a errores en la reparación de malapareamientos), *mutD* (deficiente en actividad exonucleasa 3'->5' de la DNA polimerasa III) y *mutT* (incapaz de hidrolizar 8-oxodGTP). La tasa de mutagénesis de esta cepa es 5,000 veces mayor que la de cepas silvestres de *E. coli*, obteniéndose aproximadamente 1 mutación por cada 3 kb de DNA propagado.

Los plásmidos portadores de los genes de interés se utilizaron para transformar la cepa XL1-Red siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El conjunto de colonias obtenidas se recogió e incubó en un matraz con LB durante 4 horas, precipitándose las células para la obtención de la genoteca por preparación de DNA plasmídico.

### M.3. Purificación y análisis de RNA.

#### M.3.1. Extracción de RNA total de plantas.

La extracción se realizó utilizando el método del **TRIZOL Reagent** (Amersham Pharmacia Biotech). Se recogieron muestras de tejido, se introdujeron en un tubo Eppendorf y se congelaron en nitrógeno líquido. A continuación se trituró cada muestra con un émbolo de plástico hasta convertir el material en un polvo fino. Se añadió 1 ml de **TRIZOL**, se incubaron las muestras 5 minutos a 25 °C y se centrifugaron 10 minutos a 12,000 rpm y 4 °C (Biofuge PrimoR, Heraeus) para eliminar el DNA genómico, polisacáridos y material insoluble. Se tomó el sobrenadante y se le añadieron 200 µl de cloroformo, incubándose la mezcla durante 2-3 minutos a 25 °C. Se centrifugó durante 15 minutos a 12,000 rpm y 4 °C (Biofuge PrimoR, Heraeus) y se tomó la fase acuosa, en la que se precipitó el RNA con 250 µl de isopropanol y 250 µl de una solución 1.2 M de citrato de sodio y 0.8 M de NaCl. Se incubó 10 minutos a 25 °C y se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm y 4 °C (Biofuge PrimoR, Heraeus). El precipitado de RNA se lavó con etanol 70% (v/v), se secó al vacío y se resuspendió en agua de calidad milli-Q previamente tratada con 0.1% (v/v) **DEPC**, calentándose la muestra durante 10 minutos a 55 °C para facilitar su resuspensión. Todas las soluciones utilizadas se trataron con 0.1% **DEPC** (v/v) y el material se autoclavó dos veces. Se utilizaron guantes en todo momento.

#### TRIZOL

Fenol neutro	3.8% (v/v)
Tiocianato de guanidinio	800 mM
Tiocianato de amonio	400 mM
Acetato sódico pH 5.0	100 mM
Glicerol	5% (v/v)

**DEPC** (Dietilpirocarbonato): es una sustancia muy tóxica, por lo que debe manipularse siempre en una campana de extracción de gases. Se añadió a las soluciones al 0.1% (v/v), se mantuvo durante al menos 12 horas en agitación a temperatura ambiente y se inactivó autoclavando durante 20 minutos a 120 °C y 2 atmósferas de presión.

#### M.3.2. Electroforesis de RNA.

Para verificar la calidad del RNA, se analizó una alícuota mediante electroforesis en un gel de TAE con 0.8% de agarosa (p/v) preparado con agua milli-Q tratada con 0.1%(v/v) de

DEPC en una cubeta previamente lavada con 10% (v/v) SDS y tratada durante 30 minutos con 3% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **M.3.3. Cuantificación de RNA.**

La concentración del RNA en la solución se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> (ND-1000 Spectrophotometer), de la misma forma que para la determinación de la concentración de DNA (apartado M.2.2.).

### **M.3.4. RT-PCR.**

Con esta técnica se cuantificó la abundancia del RNA mensajero (mRNA). Se usó el *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante para sintetizar cDNA a partir de mRNA de plantas. El cDNA se generó utilizando la retrotranscriptasa *Quantiscript* y una mezcla optimizada de oligo-dT y cebadores aleatorios que permiten la síntesis de cDNA desde todas las regiones del mRNA, incluyendo el extremo 5'.

Para comparar la acumulación del transcrito de los distintos genes en cada línea ensayada, se realizaron amplificaciones estándar por PCR usando el cDNA obtenido como molde y cebadores específicos para el gen cuyo nivel de expresión se pretendía cuantificar. Para normalizar la calidad y cantidad del cDNA obtenido, se amplificó este cDNA con oligonucleótidos específicos para los genes de expresión constitutiva en *Arabidopsis*  $\beta$ -TUBULINA-4 (TB4-5'/TB4-3') y ACTINA-8 (Act8\_f/Act8\_r).

## **M.4. Transformación de los distintos organismos utilizados.**

### **M.4.1. Transformación de *E. coli*.**

#### **M.4.1.1. Preparación de células competentes de *E. coli*.**

Se utilizó el método descrito por Hanahan (1983). Se inocularon 5 ml de medio  $\Phi$  o medio LB con una colonia de la estirpe apropiada y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.3. Con este precultivo, se inocularon 100 ml de medio  $\Phi$  o medio LB, precalentado a 37 °C, que se incubó con agitación de 300-350 rpm hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.5. Las células se recogieron centrifugando este cultivo a 2,500 g durante 5 minutos a 4 °C (Varifuge 20 RS, Heraeus, rotor Kontron-Hermle A6.14) y se resuspendió el sedimento en 30 ml de **solución TFB1** fría. Tras 15 minutos de incubación en hielo, las células se centrifugaron de nuevo en las condiciones descritas anteriormente y se resuspendieron en 4 ml de **solución TFB2** fría. Finalmente se dispensaron en alícuotas de 100-200  $\mu$ l, que se congelaron a -70 °C hasta su uso.

### Solución TFB1.

RbCl	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
Acetato potásico	30 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Glicerol	15% (v/v)

Se ajustó el pH a 5.8 con una solución 0.2 M de ácido acético, se esterilizó por filtración y se conservó a -20 °C.

### Solución TFB2.

CaCl <sub>2</sub>	75 mM
MOPS pH 7.0	10 mM
RbCl	10 mM
Glicerol	15% (v/v)

Se esterilizó por filtración y se conservó a -20 °C.

#### M.4.1.2. Transformación de células de *E. coli* competentes por choque térmico.

Se añadieron 10-100 ng de DNA plasmídico en un volumen máximo de 10 µl a alícuotas de 100-200 µl de células competentes y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Se aplicó un choque térmico de 42 °C durante 30-60 segundos y, tras añadir 1 ml de SOC, se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron por centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto (Biofuge Pico, Heraeus) y se extendieron con bolas de vidrio de 4 mm de diámetro en placas de LB suplementadas con el antibiótico necesario. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

#### M.4.1.3. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*.

En las operaciones en las que se necesitó una eficiencia de transformación de  $\sim 10^9$ - $10^{10}$ , se prepararon células competentes transformables por electroporación según el protocolo descrito por Ausubel *et al.* (1987). Se inocularon 5 ml de medio  $\Phi$  o medio LB con una colonia de la estirpe apropiada y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Este precultivo se utilizó para inocular 500 ml de medio  $\Phi$  o medio LB, que se incubó a 37 °C en agitación a 300 rpm hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> de  $\sim 0.5$ - $0.7$ . Las células se enfriaron en hielo durante 20 minutos y se recogieron centrifugando a 4,000 g y 4 °C durante 15 minutos (Varifuge 20 RS, Heraeus,

rotor Kontron-Hermle A6.14). Se resuspendió el sedimento sucesivamente en 500, 250 y 20 ml de glicerol 10% (v/v) enfriado en hielo, recogándose las células después de cada resuspensión centrifugando a 4,000 g y 4 °C durante 15 minutos (Varifuge 20 RS, Heraeus, rotor Kontron-Hermle A6.14). El sedimento del último centrifugado se resuspendió en 1-2 ml de glicerol 10% (v/v), se almacenó en alícuotas de 100-200 µl y se conservó a -70 °C.

#### **M.4.1.4. Transformación de células de *E. coli* competentes por electroporación.**

Se descongelaron las células en hielo. Para cada muestra, se colocó en hielo un tubo Eppendorf de 1.5 ml y una cubeta de electroporación de 0.1 cm. Se añadieron al tubo Eppendorf 40 µl de la suspensión de células y 1-2 µg de DNA y se incubó la mezcla en hielo durante 1 minuto. La mezcla se transfirió al fondo de la cubeta de electroporación y se le aplicó un pulso de 1.8 kV utilizando un electroporador MicroPulser™ (BioRad). Inmediatamente después se añadió 1 ml de medio SOC a la cubeta, se transfirió la suspensión a un tubo de propileno de 17x100 mm y se incubó a 37 °C y 225 rpm durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, las células se sembraron en medio selectivo.

#### **M.4.2. Transformación de *A. tumefaciens*.**

##### **M.4.2.1. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*.**

Se utilizó el protocolo de Holsters *et al.* (1978). Se inocularon 5 ml de medio YEP con una colonia de la estirpe adecuada y se incubaron durante toda la noche a 28 °C. Se tomaron 2 ml de este precultivo y se utilizaron para inocular 80 ml del mismo medio, que se incubó a 28 °C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.5-1. Se recogieron las células por centrifugación a 3,000 g y 4 °C (Varifuge 20 RS, Heraeus, rotor Kontron-Hermle A6.14) durante 10 minutos y se resuspendieron en 1.6 ml de CaCl<sub>2</sub> frío. Finalmente se dispensaron en alícuotas de 100-200 µl, que se congelaron a -70 °C hasta su uso.

##### **M.4.2.2. Transformación de células de *A. tumefaciens* competentes por choque térmico.**

Se añadió al menos 1 µg de DNA plasmídico a 100 µl de células competentes y se congelaron en nitrógeno líquido. Se descongelaron incubando a 37 °C durante 5 minutos, se les añadió 1 ml de medio YEP y se incubaron en agitación suave a 28 °C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron por centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto (Biofuge Pico, Heraeus) y se extendieron con bolas de vidrio de 4 mm de diámetro en placas de LB suplementadas con el antibiótico necesario. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28 °C. Los transformantes se confirmaron haciendo una preparación de DNA

plasmídico (apartado M.2.1.1.2.), retransformando *E. coli* (apartado M.4.1.2.) y analizando con enzimas de restricción el plásmido obtenido siguiendo el método del apartado M.2.1.1.1.

#### **M.4.2.3. Preparación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*.**

En las operaciones en las que se necesitó una eficiencia de transformación de  $\sim 10^9$ - $10^{10}$ , se prepararon células competentes transformables por electroporación según el protocolo descrito por Lin (1995). Se inocularon 5 ml de medio YEP con una colonia de la estirpe adecuada y se incubaron durante toda la noche a 28 °C. Se tomaron 2 ml de este precultivo y se utilizaron para inocular 1.5 l del mismo medio, que se incubó a 28 °C y 300 rpm hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.5-1. Las células se recogieron centrifugando a 3,000 g y 4 °C durante 10 minutos (Varifuge 20 RS, Heraeus, rotor Kontron-Hermle A6.14) y se colocaron en hielo, donde se lavaron dos veces sucesivas resuspendiendo en  $\sim 50$  ml de glicerol 10% (v/v) estéril y enfriado en hielo, llevando el volumen a 500 ml con la misma solución y centrifugando a 3,000 g y 4 °C durante 10 minutos (Varifuge 20 RS, Heraeus, rotor Kontron-Hermle A6.14). El sedimento se resuspendió en 500  $\mu$ l de sorbitol 1 M estéril y enfriado en hielo, y se repartió en tubos Eppendorf de 1.5 ml en alícuotas de 200  $\mu$ l, que se almacenaron a -70 °C.

#### **M.4.2.4. Transformación de células de *A. tumefaciens* competentes por electroporación.**

Se añadieron 1-2  $\mu$ g de DNA en un volumen máximo de 5  $\mu$ l a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se colocó en hielo. Por cada muestra, se añadió 1 ml de YEP a un tubo de 17x100 mm y se colocó una cubeta de electroporación de 0.1 cm en hielo. A cada muestra se le añadieron 20  $\mu$ l de células competentes descongeladas en hielo y se mezcló con suavidad. La mezcla se transfirió al fondo de una cubeta de electroporación y se le aplicó un pulso de 2.2 kV utilizando un electroporador MicroPulser™ (BioRad). Inmediatamente después se utilizó el medio YEP en el tubo de 17x100 mm para transferir las células de la cubeta al tubo. Éste se incubó a 28 °C y 250 rpm durante 3 horas y las células se sembraron finalmente en medio selectivo.

#### **M.4.3. Transformación de levaduras.**

Se utilizó el método del acetato de litio, como se describe en Elble (1992), basado en el método desarrollado por Ito *et al.* (1983). Se inoculó una colonia en 5 ml de medio YPD y se dejó en agitación toda la noche a 28 °C. Se tomaron  $\sim 2 \times 10^8$  células (D.O.<sub>600</sub> 0.5 equivale a  $\sim 5 \times 10^6$  células/ml), se recogieron por centrifugación y se les añadieron 1  $\mu$ g de DNA plasmídico y 500 ml de **PLATE**. Se incubaron las células en esta solución durante 24 horas a 25 °C y, transcurrido este tiempo, se recogieron por centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto (Biofuge Pico, Heraeus) y se extendieron con bolas de vidrio de 4 mm de diámetro en placas de medio YNB selectivo.

## Solución PLATE

PEG 4000	40% (v/v)
Acetato de Litio	100 mM
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA-Na <sub>2</sub> pH 8.0	1 mM

### M.4.4. Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

#### M.4.4.1. Preparación de las células de *A. tumefaciens*.

Se siguió el protocolo descrito por Bechtold *et al.* (1993). Se inoculó una colonia de *A. tumefaciens* portadora de la construcción deseada en 5 ml de LB suplementado con kanamicina y se incubó durante 48 horas a 28 °C en agitación. Con este precultivo se inocularon 500 ml de medio LB suplementado con kanamicina contenidos en un matraz de 2 litros y se incubó ~16-20 horas a 28 °C en agitación hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> de 1.4-2. Las células se recogieron a 3,000 g y 4 °C durante 10 minutos (Varifuge 20 RS, Heraeus, rotor Kontron-Hermle A6.14) y se resuspendieron en **solución de transformación** de preparación reciente hasta llevarlas a una O.D.<sub>600</sub> de ~0.8

#### Solución de transformación.

Sacarosa	5 g/l
Sales MS	2.2 g/l
Silwet L-77	0.02% (v/v)

El pH se ajustó a 5.7 utilizando KOH.

#### M.4.4.2. Transformación de plantas de *A. thaliana*.

Se requieren plantas cultivadas en suelo y que estén iniciando la floración en el momento de ser transformadas (5-6 semanas desde la germinación). Durante los días previos a la transformación, se podaron los escapos principales para producir una pérdida de la dominancia apical y promover el crecimiento de más tallos desde la roseta. El día de la transformación, se eliminaron todas las flores abiertas y las silicuas formadas. La agroinfección se llevó a cabo sumergiendo los primordios florales en la suspensión de *Agrobacterium*, obtenida como se describe en el apartado anterior, durante 30 segundos (Clough y Bent, 1998). A continuación se cubrió la parte aérea de la planta con plástico transparente para mantener una humedad elevada en la zona agroinfectada y se mantuvo en la oscuridad



durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el plástico, se dispusieron los Aracons™ (Lehle Seeds, Round Rocks, TX, EE. UU.) y se continuó con la irrigación normal de la planta durante 3 semanas.

#### **M.4.4.3. Selección de transformantes y propagación.**

Las semillas transgénicas (T1) se hicieron germinar *in vitro* sembrándolas en placas de MS suplementado con 50 µg/ml de kanamicina o 25 µg/ml de higromicina.

Para la selección con kanamicina, las placas se incubaron como se describe en el apartado M.3.1.3. A los 7 días, se tomaron las plántulas con resistencia al antibiótico (con presencia de cotiledones verdes y desarrollo de raíz) y se transfirieron a placas de MS sin antibiótico utilizando pinzas esterilizadas por calor. Se incubaron verticalmente y, a los 4-5 días, se transfirieron a suelo y se cultivaron hasta recolectar sus semillas (T2).

Para la selección con higromicina, las placas se incubaron apiladas, con poca iluminación y ~20 °C de temperatura. A los 7 días, se tomaron las plántulas con resistencia al antibiótico (con el hipocotilo elongado) y se transfirieron a placas de MS sin antibiótico utilizando pinzas esterilizadas por calor. Se incubaron verticalmente y, a los 4-5 días, se transfirieron a suelo y se cultivaron hasta recolectar sus semillas (T2).

#### **M.4.4.4. Presencia, expresión y número de copias del transgén.**

##### **M.4.4.4.1. Presencia.**

Para determinar la presencia del transgén, se tomaron 1 o 2 hojas de la roseta basal de la planta y se realizó una extracción de DNA como se describe en el apartado M.2.1.2. Éste se utilizó como molde para reacciones de PCR con oligonucleótidos propios del transgén y del gen NPTII, que confiere resistencia a kanamicina.

##### **M.4.4.4.2. Expresión.**

Para determinar de forma cualitativa la expresión del transgén, se tomaron 1 o 2 hojas de la roseta basal de la planta y se realizó una extracción de RNA como se describe en el apartado M.3.1. Se generó cDNA a partir del RNA obtenido (ver apartado M.3.4.) y se empleó como molde en reacciones de RT-PCR con oligonucleótidos propios del transgén. Para evaluar la cantidad y calidad del cDNA de las distintas líneas se utilizaron oligonucleótidos que amplificaban fragmentos de los genes de expresión constitutiva en *Arabidopsis* β-TUBULINA-4: TB45'/ TB4-3' y ACTINA-8 (Act8\_f/Act8\_r).

#### **M.4.4.4.3. Número de copias.**

Las semillas T2 se sembraron en medio MS suplementado con kanamicina o higromicina. El recuento de segregantes para la resistencia a los antibióticos nos permitió determinar la presencia y número de copias del transgén.

#### **M.4.4.5. Fijación de líneas transgénicas homocigotas.**

Una vez comprobada la presencia del transgén en las distintas líneas (apartado M.4.4.4.1), se procedió a la fijación de líneas homocigotas. Las semillas segregantes T2 se sembraron en medio MS suplementado con kanamicina o higromicina, seleccionándose 7-10 plantas resistentes por cada línea. Estas plantas se transplantaron a tierra, donde se dejaron crecer hasta obtener su descendencia por autofecundación (T3). Se recolectaron las semillas T3 de cada una de las líneas individuales y se sembraron en MS suplementado con el antibiótico necesario, seleccionándose las líneas homocigotas por no presentar segregación en la resistencia a éste.

#### **M.5. Obtención de líneas de dobles mutantes mediante cruzamiento clásico.**

Las plantas destinadas a ser los parentales se sembraron en macetas individuales en el invernadero. En la planta que serviría como parental femenino se dejó un único escapo, del que se eliminaron todas las flores abiertas y primordios florales que no se iban a fecundar. Se emasculó el primordio seleccionado utilizando pinzas de relojero y una lupa, y se fecundó tomando un estambre de la planta utilizada como parental masculino e impregnando el estigma con su polen. El primordio fecundado se cubrió con plástico transparente para mantener una alta humedad hasta la formación de la silicua y ésta, una vez madura, se cosechó en un tubo Eppendorf, donde se dejaron secar las semillas. Las semillas F1 secas se sembraron en el suelo y, una vez obtenidas las semillas F2 por autopolinización de las plantas, se sembraron en suelo para seleccionar los dobles mutantes por PCR.

#### **M.6. Caracterización de transformantes de levadura.**

La tolerancia a salinidad de los transformantes de levadura se caracterizó en medio sólido AP determinando su capacidad de formar colonias mediante ensayos por goteo. Se inoculó una colonia de cada transformante en 5 ml de medio YNB selectivo y se incubó en agitación a 28 °C hasta saturación ( $O.D._{600} \sim 2.5$ ). A partir de estos cultivos se prepararon cuatro diluciones decimales seriadas y se dispusieron 5  $\mu$ l de cada una en medio AP suplementado con las concentraciones de NaCl indicadas. Las placas se incubaron a 28 °C durante 3-5 días.

## **M.7. Caracterización fisiológica de plantas de *A. thaliana*.**

### **M.7.1. Ensayos de crecimiento en medio salino sólido.**

Para los análisis de tolerancia salina, se recolectaron semillas T2 y se germinaron *in vitro* en placas de MS suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, incubándose en posición vertical, o con 25 µg/ml de higromicina, incubándose las placas apiladas y con poca luz. A los 7 días se seleccionaron plántulas con clara resistencia al antibiótico y se transfirieron, utilizando pinzas esterilizadas por calor, a placas de MS 1X suplementadas con la concentración de NaCl o LiCl indicada en cada caso. Éstas se incubaron en vertical en la cámara de cultivo *in vitro* en condiciones controladas durante 7-14 días. Transcurrido ese tiempo, se midió la elongación de la raíz y el peso fresco de planta completa, representándose ambos datos en gráficos de barras.

### **M.7.2. Ensayos de crecimiento en medio salino líquido.**

Se germinaron semillas T2 *in vitro* en placas de MS suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, incubándose en posición vertical. A los 7 días se seleccionaron plántulas con clara resistencia al antibiótico y, utilizando pinzas esterilizadas por calor, se transfirieron 20 plántulas a cada uno de los matraces erlenmeyer de 250 ml, llenos cada uno con 50 ml de medio MS 1X suplementado con la concentración de sal indicada. Los matraces se incubaron en la cámara de cultivo *in vitro* durante 5-10 días en agitación suave (80 rpm). Transcurrido este tiempo, se pesaron las plántulas en grupos de 5-8 y se guardaron en tubos Eppendorf para la extracción de clorofila.

### **M.7.3. Determinación del contenido en clorofila.**

El contenido en clorofila es un parámetro que correlaciona fuertemente con la tolerancia de las plantas a salinidad. Para determinarlo, se extrajo la clorofila añadiendo a las plántulas, contenidas en un tubo Eppendorf, 1 ml de acetona al 80% (v/v) e incubando a 25 °C y en la oscuridad durante 20-24 horas. A continuación se utilizó un espectrofotómetro Biomate 3 (Thermo Fischer Scientific) para medir la absorbancia de las muestras a 646 y 663 nm, y se aplicaron las fórmulas de Lichtenthaler *et al.* (1987).

$$\text{Chl A} = 12.25 \cdot A_{663} - 2.79 \cdot A_{646}$$

$$\text{Chl B} = 21.5 \cdot A_{663} - 5.1 \cdot A_{646}$$

$$\text{Chl Total} = 7.15 \cdot A_{663} + 18.71 \cdot A_{646}$$

El valor obtenido en cada medida se dividió entre el peso de cada muestra y se representaron los mg de clorofila/ mg de tejido en un gráfico de columnas.

#### **M.7.4. Ensayos en cultivo hidropónico.**

Las plántulas de 7 días de las distintas líneas se transfirieron a contenedores con la solución nutritiva descrita en el apartado M.1.3.5. suplementada con las concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y  $\text{K}^+$  indicadas en cada caso. La solución se renovó cada dos semanas y se tomaron muestras de las plantas al finalizar el tratamiento.

#### **M.7.5. Medida de contenidos iónicos.**

Una vez terminado el tratamiento, las plantas se cosecharon y pesaron, separándose la parte aérea de la raíz. Las raíces se lavaron con agua desionizada y se secaron con papel de filtro antes de pesarlas. En algunos casos, el material se trituró con émbolos de plástico, utilizándose como extracto el agua liberada con la rotura de tejidos. En otros, el material se desecó en estufa a 65 °C durante toda la noche y los iones se extrajeron añadiendo 1 ml de agua milli-Q e incubando a 95 °C durante 1 hora. Independientemente del procedimiento utilizado, se prepararon muestras con la dilución apropiada del extracto en agua milli-Q y se determinó el contenido de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  utilizando un espectrómetro de absorción atómica (1100B, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

#### **M.8. Secuenciación.**

Las construcciones preparadas a partir de fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron posteriormente para verificar la fidelidad de la polimerasa y comprobar su correcta replicación. La secuenciación se llevó a cabo por el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen, S.L.

#### **M.9. Herramientas Informáticas.**

##### **M.9.1. Programas Informáticos.**

Para la manipulación de secuencias y construcción de alineamientos, se utilizó el paquete informático *DNA Star* (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EE. UU.).

##### **M.9.2. Herramientas de Internet.**

Las bases de datos más utilizadas en este trabajo fueron:

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

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

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

## IV. RESULTADOS.

### R.1. La actividad del antiportador SOS1 controla otras funciones en la planta, además del transporte de Na<sup>+</sup>.

#### R.1.1. Función del antiportador SOS1 en la homeostasis de K<sup>+</sup>. Interacción funcional entre SOS1 y AKT1

##### R.1.1.1. Crecimiento del mutante *sos1-1* en ausencia de Na<sup>+</sup>.

Los mutantes *sos1* (*Salt Overly Sensitive 1*) se aislaron por su alta sensibilidad a NaCl en un rastreo de semillas mutagenizadas con etilmetanosulfonato. Además se vio que presentaban déficit de crecimiento en un medio MS modificado pobre en K<sup>+</sup> (< 1 mM) (Wu *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998). Posteriormente el mapeo de la mutación, la secuenciación del gen, y la realización de ensayos de transporte y de expresión heteróloga en levadura demostraron que se trataba de un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> con escasa afinidad por el K<sup>+</sup> (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2003), por lo que era improbable que SOS1 mediara directamente la toma de K<sup>+</sup> del suelo. No obstante, Garcíadeblás *et al.* (2007) describieron que los transportadores SOS1 de *Arabidopsis* y *Cymodocea nodosa* fueron capaces de complementar la deficiencia de crecimiento en medios con bajos niveles de K<sup>+</sup> de una cepa mutante de *E. coli*. En el caso de que SOS1 fuese capaz de catalizar directamente el transporte de K<sup>+</sup>, cabría esperar que el defecto de crecimiento de las plantas mutantes *sos1* de *Arabidopsis* fuese independiente de la presencia de Na<sup>+</sup> en el medio. Puesto que los medios utilizados habitualmente para el cultivo de plantas contienen concentraciones de Na<sup>+</sup> de ~4 mM (Murashige y Skoog, 1962; [www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/281230.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/281230.pdf)), se decidió utilizar el cultivo hidropónico (ver apartado M.7.4.), ya que permite un control preciso de las concentraciones de macro y micronutrientes usados en la solución nutritiva para testar el comportamiento del mutante *sos1* de *Arabidopsis*. Se formuló una solución basada en la empleada por Hewitt y Notton (1966), pero libre de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (ver apartado M.1.3.5.). Plántulas de una semana de edad germinadas en agua Elix se transfirieron a solución nutritiva preparada a una concentración de 1 o 10 mM de K<sup>+</sup> mediante la adición de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M, suplementada o no con 5 mM NaCl, y se dejaron crecer durante 2 semanas adicionales. Tras el tratamiento, las plantas se fotografiaron y se midió el peso fresco de la parte aérea (Figura R.1.1). Tanto la concentración de Na<sup>+</sup> como las de K<sup>+</sup> utilizadas no produjeron efectos fenotípicos observables en la línea silvestre Col-0 *gl1*, que se desarrolló con normalidad bajo los distintos tratamientos. En el mutante *sos1-1*, sin embargo, se observó una fuerte reducción del crecimiento en presencia de Na<sup>+</sup> que fue atenuada al aumentar la concentración de K<sup>+</sup> a 10 mM en el medio. En ausencia de Na<sup>+</sup>, las plantas de la línea mutante *sos1* recuperaron la capacidad de crecimiento en 1 mM de K<sup>+</sup> y fueron indistinguibles las de la línea control en 10 mM de K<sup>+</sup>. Por tanto, el fenotipo de sensibilidad a bajo K<sup>+</sup> es condicional a la presencia de Na<sup>+</sup> en el medio.

Este resultado, si bien no basta por sí mismo para determinar la causa exacta del fenotipo de crecimiento reducido en el mutante *sos1-1* en bajo  $K^+$ , sí confirma que se trata de un efecto estrictamente dependiente de la presencia de  $Na^+$  en el medio y, por lo tanto, sugiere que SOS1 no media directamente la absorción de  $K^+$ .

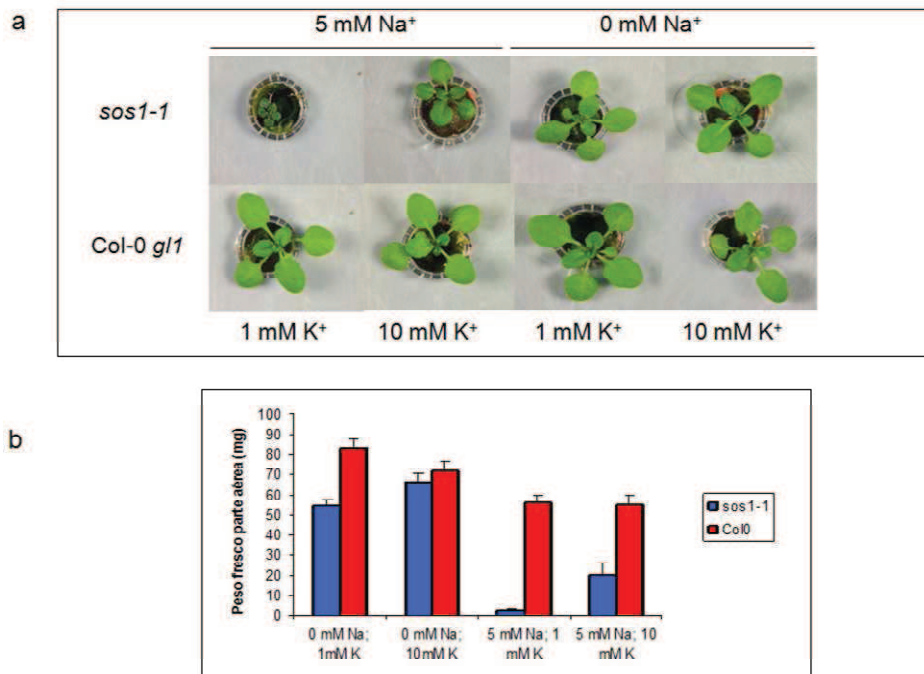


Figura R.1.1. Plantas de la línea silvestre Col-0 *gl1* y de la línea mutante *sos1-1* cultivadas en medio hidropónico en presencia y ausencia de sodio. Las plantas se cultivaron en solución nutritiva control (1 mM  $K^+$  sin  $Na^+$ ) o suplementada con 10 mM de  $K^+$ , en presencia y ausencia de  $Na^+$  (NaCl 5 mM). A las 2 semanas, se fotografiaron plantas representativas para cada línea y tratamiento (a), se cosecharon y se determinó el peso fresco de la parte aérea (b).

#### R.1.1.2. Obtención y genotipado del doble mutante *akt1 sos1*.

Mediante estudios de electrofisiología, Qi y Spalding (2004) mostraron que el canal de entrada de  $K^+$  AKT1 constituía una diana de toxicidad por  $Na^+$ , ya que su actividad se vio bloqueada por la adición directa al citoplasma de una solución 10 mM de NaCl. Se propuso que SOS1, al expulsar el  $Na^+$  de la raíz, actuaría protegiendo a AKT1 del efecto nocivo de la salinidad y permitiendo mantener una correcta homeostasis de  $K^+$ . Para corroborar esta hipótesis usando nuestro sistema hidropónico, se decidió incluir una línea mutante para el canal AKT1. Además, la obtención de un doble mutante *sos1 akt1* generaría un conocimiento más profundo de este fenómeno, ya que, mediante la comparación de su fenotipo con los de los mutantes simples, se podría establecer la posible interacción funcional de ambas proteínas en la toma de  $K^+$  en presencia de  $Na^+$ .

El mutante *akt1-2* es una línea homocigota perteneciente a la colección de mutantes de Arabidopsis generada en el "Salk Institute Genomic Analysis Laboratory" (La Jolla, CA, EE.UU.)

mediante transformación de plantas del ecotipo *Columbia-0* con el vector pROK2. La inserción de T-DNA se encuentra entre los nucleótidos 813 y 1,371 desde el codón de inicio de *AKT1* (Alonso *et al.*, 2003). El doble mutante se obtuvo realizando un cruzamiento clásico entre las líneas homocigotas *sos1-1* y *akt1-2* (ver apartado M.5.). Las plantas F1 obtenidas en la descendencia de este cruzamiento eran todas heterocigotas para ambas mutaciones, por lo que se autofecundaron para obtener la descendencia de semillas segregantes F2, entre las que se buscaron los dobles mutantes homocigotos *akt1 sos1*. Para ello, la descendencia F2 se sembró en suelo y, una vez las plantas hubieron desarrollado al menos 4 hojas verdaderas, se extrajo el DNA de 50-75 mg de tejido foliar y se realizó un genotipado por PCR. Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos AKT1\_f/AKT1\_r, que amplifican una región de 727 pb únicamente en el alelo silvestre de *AKT1*, y AKT1\_r/LBb1.3, de los cuales el primero hibrida a 60 pb del punto de inserción y el segundo a 294 pb del extremo del borde izquierdo del T-DNA y está dirigido hacia el exterior. El oligonucleótido LBb1.3 es el que utilizaron los suministradores de estas semillas para localizar los puntos de inserción en cada línea de mutantes (<http://signal.salk.edu/pBIN-pROK2.txt-new>). Con esta pareja de oligonucleótidos se amplifica una banda de 354 pb únicamente en el alelo mutante. Si la línea es homocigota para la inserción, no se amplifica ninguna banda con la pareja de oligonucleótidos AKT1\_f/AKT1\_r, ya que ésta sería demasiado grande (incluiría la región comprendida entre los oligonucleótidos más el T-DNA) para amplificarse en las condiciones seleccionadas en la reacción de PCR. El mutante *sos1-1* contiene una deleción de 14 pb entre los nucleótidos 1330 y 1343 desde el codón de inicio de *SOS1* (Shi *et al.*, 2000). Para distinguir el alelo mutante *sos1-1* del silvestre se diseñaron los oligonucleótidos *sos1-1\_f* y *sos1-1\_r*, que amplifican una región de 144 pb alrededor de la deleción. De este modo, el DNA de la línea silvestre amplificaría un fragmento de 144 pb, mientras que el del mutante *sos1-1* amplificaría uno de 130 pb, distinguible del anterior por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Figura R.1.2 (a)). De una población de 40 líneas independientes se aislaron 2 líneas dobles mutantes por amplificar sólo los alelos silvestres de *SOS1* y *AKT1* (Figura R.1.2 (b)). El porcentaje (5%) se ajusta a la segregación esperada de 1/16.



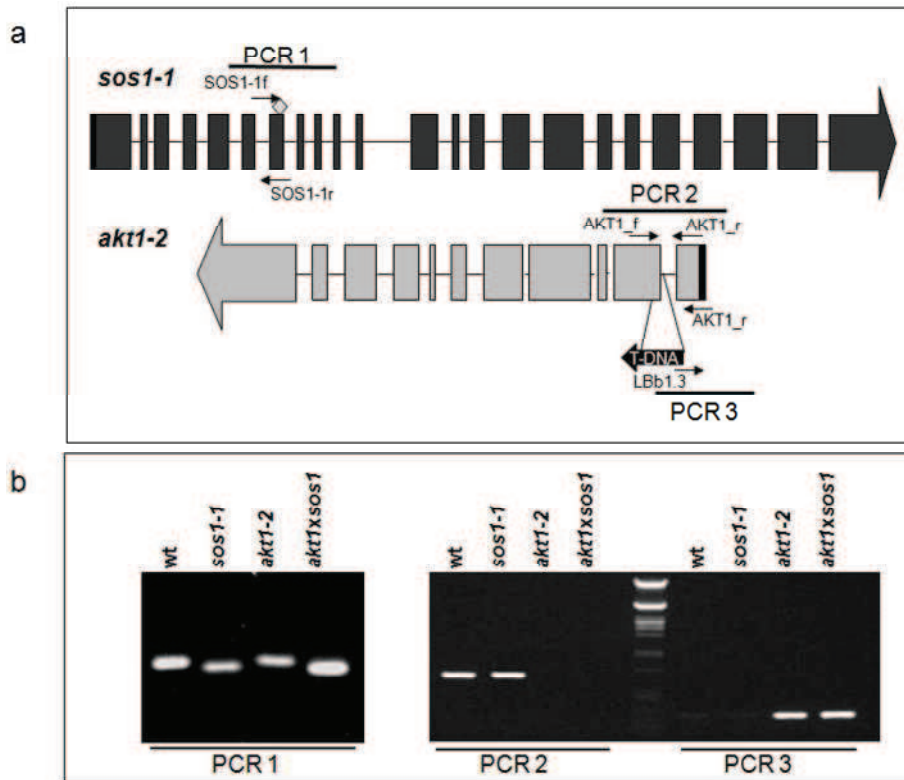


Figura R1.2. Genotipado de la F2 del cruce de dos líneas parentales homocigotas para las mutaciones *sos1-1* y *akt1-2*. Se cruzaron ambas líneas homocigotas y la descendencia se sembró en tierra para obtener la F2, de la que se extrajo el DNA. En el panel a se muestra la representación esquemática de los alelos mutantes *sos1-1* (donde el rombo gris representa la delección de 14 pb) y *akt1-2* (donde la flecha negra representa la inserción de T-DNA), y se describen las amplificaciones realizadas. En el panel b se ilustra el resultado de estas amplificaciones para la línea silvestre Col-0 *gl1* (wt), los dos alelos mutantes simples (*sos1-1* y *akt1-2*) y el alelo mutante doble (*akt1xsos1*).

### R.1.1.3. Caracterización fisiológica del mutante *akt1* y del doble mutante *akt1 sos1* en cultivo hidropónico.

La solución nutritiva (apartado R.1.1.1) se suplementó con distintos volúmenes de  $K_2SO_4$  0.5 M para preparar medios a las concentraciones de  $K^+$  de 10  $\mu M$ , 100  $\mu M$ , 1 mM y 10 mM, que se utilizaron en el cultivo hidropónico de plantas de la línea silvestre Col-0 *gl1*, las dos líneas mutantes simples *sos1-1* y *akt1-2*, y el mutante doble *akt1 sos1*. Plántulas de 7 días germinadas en agua Elix se transfirieron a estas soluciones, en presencia o ausencia de  $Na^+$  (5 mM NaCl), y se fotografiaron a las 3 semanas. En presencia de  $Na^+$  (Figura R.1.3 (a)), volvió a observarse el defecto de crecimiento, atenuado al aumentar la concentración de  $K^+$ , para el mutante *sos1-1*. El mutante *akt1-2* mostró un crecimiento ligeramente menor que la línea silvestre entre 10  $\mu M$  y 1 mM de  $K^+$ , ya que es precisamente éste el rango en el que actúa AKT1 (Lagarde *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1998). Para todas las concentraciones de  $K^+$  ensayadas, el doble mutante *akt1 sos1* exhibió un fenotipo incluso más severo que el del mutante simple *sos1-1*, demostrando un efecto aditivo de la menor toma de  $K^+$  derivada de la falta de un canal AKT1 funcional sobre el defecto de crecimiento producido por la mutación *sos1-1*. Además, es probable que la falta de función de AKT1 resulte en la hiperpolarización de la membrana plasmática, contribuyendo así a una mayor entrada de  $Na^+$ . Por otra parte, la

debilidad del fenotipo producido por la mutación *akt1-2* en comparación con el causado por la mutación *sos1-1* demuestra que la hipotética inhibición de la toma de  $K^+$  a través de AKT1 por la sobreacumulación de  $Na^+$  en la raíz de plantas portadoras de la mutación *sos1-1* no es la principal causa de su defecto en el crecimiento, refutando la hipótesis de Qi y Spalding (2004).

La línea mutante *sos1-1* no mostró ningún fenotipo en ausencia de  $Na^+$  (Figura R.1.3 (b)), sino que se desarrolló al mismo nivel que el control Col-0 *gl1*, como ya se vio en el apartado R.1.1. La línea mutante *akt1-2*, por su parte, volvió a presentar un crecimiento dependiente de  $K^+$  que, excepto en el medio con  $10 \mu M$  de  $K^+$ , fue equiparable al mostrado en presencia de  $Na^+$ . Bajo esta concentración de  $K^+$ , todas las líneas crecieron igual en ausencia de  $Na^+$  debido a que la toma de  $K^+$  no se lleva a cabo a través de AKT1 en este rango de concentraciones, sino por HAK5 (Lagarde *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1998). Sin embargo, ambas líneas con la proteína SOS1 funcional (Col-0 *gl1* y *akt1-2*) mostraron un crecimiento ligeramente mejor en presencia de  $Na^+$ . Este resultado era previsible, ya que el  $Na^+$  a concentraciones subtóxicas puede ser beneficioso porque permite su uso como osmolito en las vacuolas (Zhu *et al.*, 1997), favoreciendo el crecimiento de las plantas. Finalmente, el doble mutante *akt1 sos1* no mostró ningún efecto aditivo respecto al mutante simple *akt1-2*, como cabría esperar teniendo en cuenta la ausencia de fenotipo de la mutación *sos1-1* al eliminar el  $Na^+$  del medio.

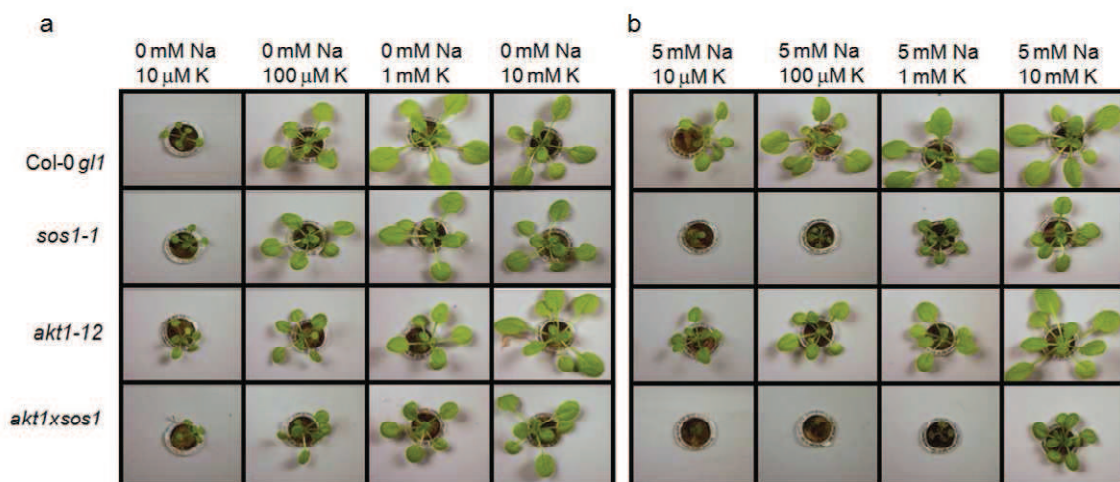


Figura R.1.3. Cultivo hidropónico en presencia y ausencia de sodio. Se cultivaron plantas de la línea silvestre Col-0 *gl1*, las líneas mutantes simples *sos1-1* y *akt1-2* y la línea doble mutante *akt1 sos1* en solución nutritiva control (a) y suplementada con 5 mM de  $Na^+$  (b) con concentraciones crecientes de  $K^+$ . A las 3 semanas se fotografiaron plantas representativas para cada línea y tratamiento.

Las plantas provenientes de los medios con las mayores concentraciones de  $K^+$  (1 y 10 mM) se dejaron crecer dos semanas más para obtener una mayor cantidad de material vegetal y los fenotipos se mantuvieron. Al final del tratamiento, las plantas se fotografiaron y pesaron (Figura R.1.4). Las diferencias de peso fresco entre líneas fueron similares para cada tratamiento tanto en parte aérea como en raíz, si bien ésta última acusó más, en general, el crecimiento a baja concentración de  $K^+$ . Dado el severo fenotipo mostrado por el doble mutante

*akt1 sos1* en el medio con 5 mM de  $\text{Na}^+$  y 1 mM de  $\text{K}^+$ , apenas se pudieron tomar muestras de parte aérea y fue imposible tomarlas de raíz. Para maximizar la cantidad de material vegetal obtenida, principalmente en raíz, se realizó también un experimento alternativo en el que plantas crecidas durante 3 semanas en solución estándar sin  $\text{Na}^+$  y con 1 mM de  $\text{K}^+$  se sometieron a 10 mM NaCl durante dos semanas, tomándose muestras de raíz y parte aérea al finalizar el tratamiento.

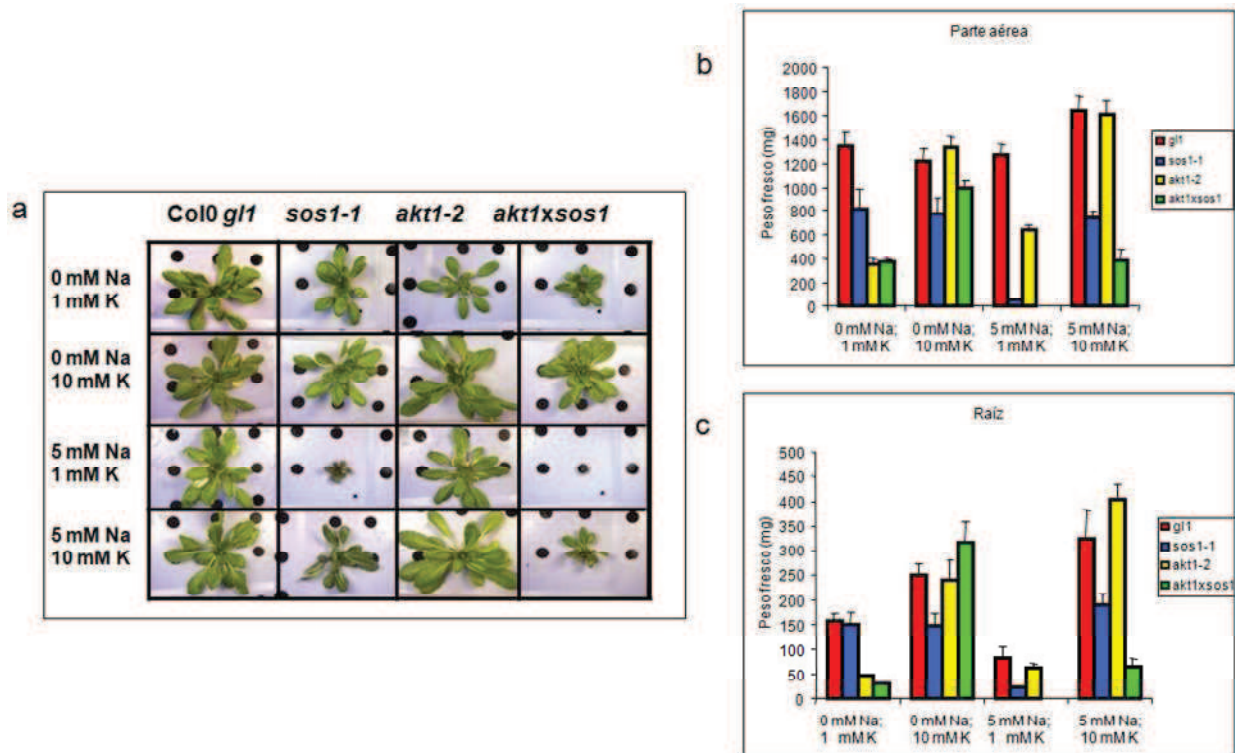


Figura R.1.4. Crecimiento de las plantas al final del tratamiento. Se descartaron las plantas cultivadas en las soluciones con concentraciones de  $\text{K}^+$  menores de 1 mM y el resto (Figuras R.1.3. y R.1.4.) se cultivaron durante 2 semanas más en medio fresco, fotografiándose (a) y pesándose la parte aérea (b) y la raíz (c) al final del tratamiento.

#### R.1.1.4. Determinación de los contenidos iónicos.

Para comprobar si las diferencias fenotípicas descritas anteriormente se correspondían con diferencias en la acumulación y translocación de iones, se tomaron muestras de raíz y parte aérea de plantas de 5 semanas (Figura R.1.4) y se determinaron las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en los tejidos utilizando un espectrómetro de absorción atómica (ver apartado M.7.5.).

Los datos obtenidos con las medidas de  $\text{Na}^+$  (Figuras R.1.5 (a) y (b) y R.1.6 (a) y (b)) coinciden con los esperados: en general, las plantas portadoras de la mutación *sos1-1* presentaron un contenido mayor de este catión. En parte aérea y ausencia de  $\text{Na}^+$  (Figuras R.1.5 (a) y R.1.6 (a)), estas diferencias fueron muy pequeñas y podrían deberse a pequeñas trazas de  $\text{Na}^+$  presentes como contaminante en las distintas sales utilizadas para preparar la solución stock. Las diferencias sólo fueron algo mayores en la raíz (Figura R.1.5 (b) y R.1.6 (b)), donde el  $\text{Na}^+$  entra por el apoplasto hasta que llega a la barrera impermeable formada por

la banda de Caspari (Azaizeh y Steudle, 1991; Cruz *et al.*, 1992) y no puede ser bombeado al exterior en las plantas portadoras de la mutación *sos1-1*, acumulándose en el córtex (Shi *et al.*, 2002). En presencia de  $\text{Na}^+$  5 mM (Figura R.1.5 (a) y (b)), el contenido en este catión no mostró diferencias entre las líneas con un alelo funcional de *SOS1*. La mutación *sos1-1* provocó una toma masiva de  $\text{Na}^+$  que se tradujo en una gran acumulación de este catión en raíz y parte aérea. El incremento de la concentración de  $\text{K}^+$  en el medio redujo considerablemente el contenido en  $\text{Na}^+$ , al dificultar la toma de este catión (Niu *et al.*, 1995). Los resultados fueron similares en el tratamiento alternativo con 10 mM de  $\text{Na}^+$  (Figura R.1.6 (a) y (b)) mostrando todas las líneas un lógico aumento en la acumulación de  $\text{Na}^+$  tanto en raíz como en parte aérea.

En ausencia de  $\text{Na}^+$ , existe una correlación entre el contenido de  $\text{K}^+$  y el fenotipo observado en las distintas líneas (Figuras R.1.5 (c) y (d) y R.1.6. (c) y (d)). La presencia de la mutación *akt1-2* produjo una menor acumulación de  $\text{K}^+$  pero este efecto desapareció al aumentar la concentración de este catión en el medio. La presencia de la mutación *sos1-1* no parece influir en la toma de  $\text{K}^+$  en ausencia de  $\text{Na}^+$ , mostrando el mutante simple *sos1-1* unos contenidos equiparables a los de la línea silvestre Col-0 *gl1*, mientras los del mutante doble *akt1 sos1* fueron similares a los del mutante simple *akt1-2*. Los contenidos iónicos fueron similares en parte aérea y raíz, indicando que las diferencias entre líneas se deben fundamentalmente a la adquisición de  $\text{K}^+$  y no a su distribución a través de la planta. En presencia de  $\text{Na}^+$  5 mM, sin embargo (Figura R.1.5 (c) y (d)), los contenidos de  $\text{K}^+$  difirieron de los esperados y no se correspondieron con los severos fenotipos observados en las plantas. El mutante simple *sos1-1* presentó un contenido de  $\text{K}^+$  mayor que la línea silvestre en parte aérea y, aparentemente, menor en raíz, lo que sugeriría una alteración en el transporte a larga distancia de este macronutriente. Además, no se vieron diferencias en el contenido de este catión entre el mutante simple *akt1-2* y el doble mutante *akt1 sos1* a pesar de la severidad del fenotipo mostrado por esta última línea.

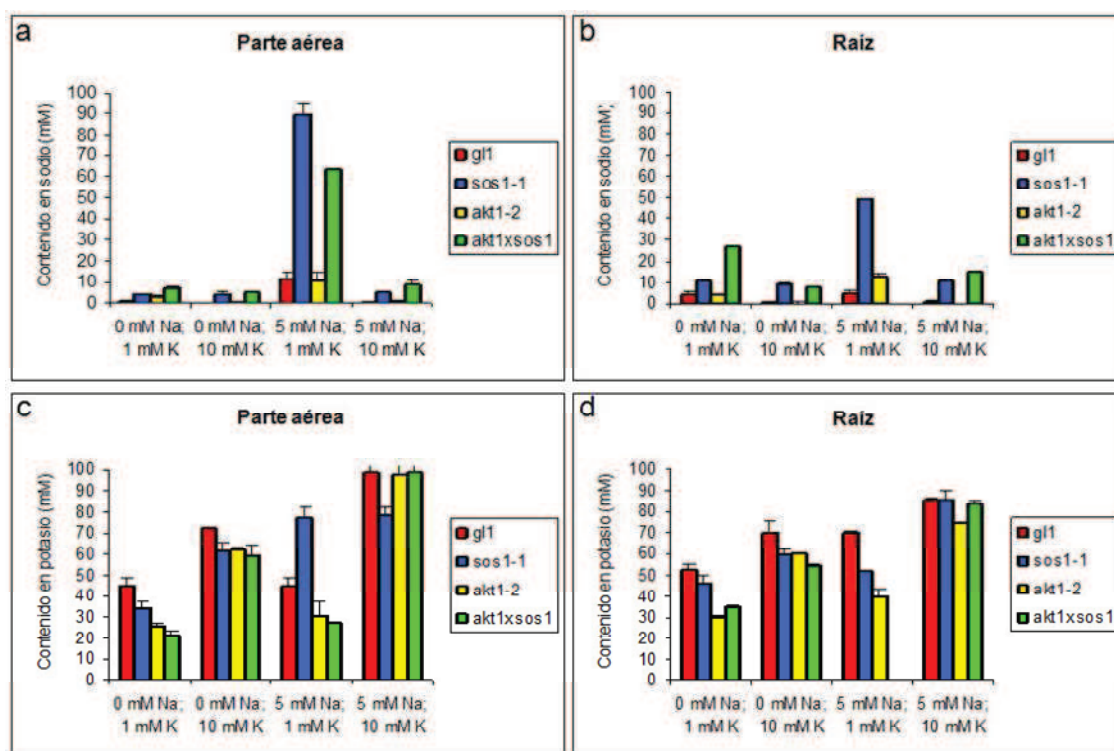


Figura R.1.5. Contenidos iónicos en parte aérea y raíz. Se tomaron muestras de las plantas al final del tratamiento (Figura R.1.4.) y se determinó por espectrometría de absorción atómica el contenido de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en parte aérea (a) y raíz (b).

Algo parecido sucedió en el experimento alternativo en el que plantas crecidas en medio hidropónico sin Na<sup>+</sup> y con 1 mM de K<sup>+</sup> se sometieron a 10 mM NaCl durante dos semanas (Figura R.1.6). El mutante *sos1-1* pasó de mostrar un contenido de K<sup>+</sup> en parte aérea significativamente menor que el de Col-0 *gl1* en ausencia de Na<sup>+</sup> a equiparar su acumulación de este catión con la de la línea silvestre tras el tratamiento con 10 mM Na<sup>+</sup>. Nuevamente, las líneas portadoras de la mutación *akt1-2* mostraron una severa reducción en la acumulación de K<sup>+</sup>, tanto en presencia como en ausencia de tratamiento salino (Figura R.1.6. (c)). La mayor cantidad de material vegetal recolectada permitió confirmar que el contenido de K<sup>+</sup> en la raíz disminuye al someter al mutante *sos1-1* a concentraciones moderadas de Na<sup>+</sup> (Figura R.1.6 (d)), sugiriendo de nuevo un aumento en la translocación de K<sup>+</sup> como consecuencia de dicho tratamiento. En el caso del doble mutante *sos1 akt1*, aunque esta vez sí se pudo recolectar suficiente material vegetal, se obtuvieron valores muy bajos al determinar el contenido en ambos cationes. Los bajos contenidos iónicos indican que el tratamiento salino causó daños tan severos que la funcionalidad de la raíz se vio afectada, por lo que las medidas no se incluyeron en la gráfica. En cambio, el alto contenido de Na<sup>+</sup> medido en las raíces del mutante *sos1-1* indica una completa funcionalidad de este órgano, validando las bajas medidas de K<sup>+</sup> obtenidas. En conjunto, los resultados de ambos ensayos demuestran que el fenotipo observado en las líneas portadoras de la mutación *sos1-1* no se debía a una menor toma de K<sup>+</sup> a través de AKT1, sino a la excesiva acumulación de Na<sup>+</sup>. El efecto aditivo observado en el mutante doble *akt1 sos1* parece deberse a la suma de la acumulación masiva de Na<sup>+</sup> y la

menor toma de  $K^+$ , que produciría una reducción del cociente  $K^+:Na^+$  respecto al del mutante *sos1-1*. Por otra parte, el mayor contenido en  $K^+$  del mutante *sos1-1* en parte aérea, junto con su menor concentración en la raíz, indica una alteración en el transporte de  $K^+$  a larga distancia, lo que podría deberse a una activación del canal de salida de  $K^+$  SKOR por despolarización de las células parenquimáticas que rodean al xilema como consecuencia del exceso de  $Na^+$ . Un efecto similar ha sido descrito en mutantes de pérdida de función para los transportadores AtHKT1;1 y OsHKT1;5, en los que aunque la mayor acumulación de  $Na^+$  en el xilema se vio acompañada por una previsible reducción en el contenido en  $K^+$ , la magnitud de ésta fue menor de lo esperado. (Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005). Horie *et al.* (2009) propusieron que el exceso de  $Na^+$  estaba favoreciendo indirectamente la liberación de  $K^+$  de las células parenquimáticas del xilema a través de canales de salida de  $K^+$ , ya que se ha demostrado la activación de algunos como KOR y NOR de cebada o SKOR de Arabidopsis por despolarización celular (Wegner y Raschke, 1994; Wegner *et al.*, 1997; Gaymard *et al.*, 1998)

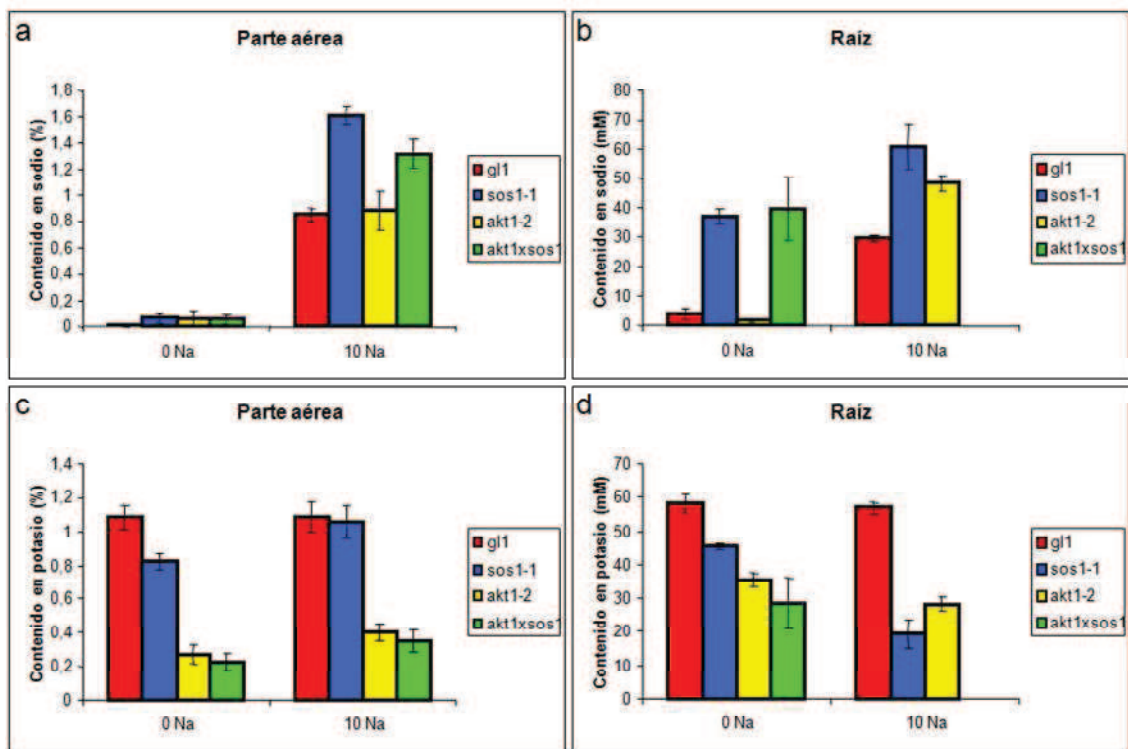


Figura R.1.6. Contenidos iónicos en parte aérea y raíz. Se tomaron muestras de las plantas al final del tratamiento y se determinó por fotometría de llama el contenido de  $Na^+$  y  $K^+$  en parte aérea (a) y raíz (b).

### R.1.2. Expresión en planta y levadura de un alelo de *SOS1* mutado en el residuo conservado de ácido aspártico en posición 201 que inhabilita el transporte de Na<sup>+</sup>.

En la naturaleza existen proteínas receptoras emparentadas con transportadores llamadas “transceptores”. Algunas conservan totalmente la función de transporte (ej: Gap1 y Pho84 de levadura), otras son fundamentalmente receptoras con una actividad transportadora residual (ej: UhpC de *E. coli*) y otras son similares a transportadores en su estructura pero carecen por completo de función transportadora (ej: Snf3 y Ssy1 de levadura). Al igual que los transportadores, alternan entre dos conformaciones para exponer o no el sitio de unión al sustrato al medio extracelular. La unión del sustrato ocasiona un cambio de conformación que permite desencadenar rutas de señalización y, en algunos casos, transporte del sustrato (Thevelein y Voordeckers, 2009). La más estudiada es Gap1 de levadura, que activa la ruta PKA para estimular rápidamente el metabolismo fermentativo en presencia de aminoácidos y otras fuentes nitrogenadas (Donaton et al., 2003). Como ya se ha indicado anteriormente, la proteína *SOS1* consta de una larga cola hidrofílica que, además de interactuar con el regulador transcripcional de genes de respuesta a estrés oxidativo RCD1 (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006), podría hacerlo con otras proteínas reguladoras, actuar como sensor de Na<sup>+</sup> o desempeñar otras funciones reguladoras aún desconocidas y que convertirían a *SOS1* en un transceptor (Zhu *et al.*, 2002; Putney *et al.*, 2002). La presencia de un residuo de ácido aspártico junto a uno de asparagina en un dominio transmembrana está muy conservada en antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de procariotas y eucariotas, habiéndose demostrado su implicación en el transporte de Na<sup>+</sup> a pH fisiológico en NHX de levadura y NHE1 de humanos (Bowers *et al.*, 2000; Murtazina *et al.*, 2001). Puesto que este aminoácido existe en el sexto dominio transmembrana de *SOS1* ocupando la posición 201, se especuló que también podría ser esencial para el transporte de Na<sup>+</sup> y que la proteína con este aminoácido mutado perdería la permeabilidad para Na<sup>+</sup> pero conservaría las hipotéticas interacciones con proteínas reguladoras en su extremo carboxiterminal al no afectar esta mutación a la estructura global de la proteína, por lo que se convertiría en una práctica herramienta para identificar nuevas funciones de *SOS1* no relacionadas con su regulación de la homeostasis iónica.

#### R.1.2.1. Caracterización funcional del alelo mutado *SOS1\_D201N* en levadura.

El ácido aspártico en la posición 201 se mutó a asparagina mediante PCR (ver apartado M.2.6.7.). Partiendo del cDNA de *SOS1* clonado en pYPGE15, se amplificaron dos fragmentos de unas 0.65 kb del extremo aminoterminal con las parejas de oligonucleótidos 5BHSOS1\_f/SOS1DN\_r y SOS1DN\_f/3BHSOS1\_r, utilizando la polimerasa de alta fidelidad *Pfu*. Los oligonucleótidos SOS1DN\_f y SOS1DN\_r hibridan con el cDNA de *SOS1* entre los nucleótidos 586 y 617 pero contienen un cambio de base en la posición 601, que se traduce en una mutación del codón GAT (ácido aspártico) a AAT (asparagina). Ambos fragmentos, purificados de un gel de TAE, se utilizaron como molde en una amplificación con *Pfu* y los

oligonucleótidos 5BHSOS1\_f y 3BHSOS1\_r. El producto de PCR, de 1.4 kb, se purificó de un gel de TAE y se clonó usando el *Blunt*<sup>®</sup>PCR Cloning Kit (Invitrogen). Para la inserción de este alelo en el vector de expresión en levadura pYPGE15, se liberó un fragmento *Xba*I/*Bam*HI de 1.3 kb portador de la mutación en el vector *Blunt*<sup>®</sup>PCR y se sustituyó con él el fragmento correspondiente del alelo silvestre clonado en el vector pYPGE15 (Quintero *et al.*, 2002) (ver apartados M.2.6.1. y M.2.6.4.).

En primer lugar, se realizó la caracterización funcional del alelo mutado en la cepa halosensible de *S. cerevisiae* AXT3K ( $\Delta$ ena1-4  $\Delta$ nha1  $\Delta$ nhx1). En levadura, la extrusión de Na<sup>+</sup> del citosol se lleva a cabo por las ATPasas de Na<sup>+</sup> ScENA1-4 y el antiportador Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ScNHA1, ambos situados en la membrana plasmática (Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995; Bañuelos *et al.*, 1998), mientras la compartimentación de Na<sup>+</sup> es debida al antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> endosomal ScNHX1 (Nass *et al.*, 1997; Darley *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2000). La cepa AXT3K carece de los transportadores de Na<sup>+</sup> esenciales para la halotolerancia, por lo que es incapaz de crecer en medios con una concentración de NaCl mayor de 50 mM (Quintero *et al.*, 2002). Tanto el alelo silvestre *SOS1* como el mutado *SOS1\_D201N* se expresaron en esta cepa, en presencia y ausencia del complejo SOS2/SOS3, en medio AP normal o suplementado con NaCl 50 mM (Figura R.1.7) (ver apartados M.4.3. y M.6.). El alelo silvestre *SOS1* fue por sí mismo capaz de suprimir parcialmente el fenotipo de halosensibilidad, efecto que se incrementó considerablemente por la coexpresión con el complejo SOS2/SOS3. Sin embargo, el alelo mutado *SOS1\_D201N* fue incapaz de suprimir este fenotipo, mostrando los transformantes una halotolerancia comparable a la observada en los controles transformados con el vector pYPGE15 vacío y mucho menor que la aportada por el alelo silvestre, tanto en presencia como en ausencia del complejo SOS2/SOS3. Estos resultados demuestran la importancia de este aminoácido en el transporte de Na<sup>+</sup>, ya que, al menos en levadura, se revela como un residuo esencial en la funcionalidad del antiportador *SOS1*.

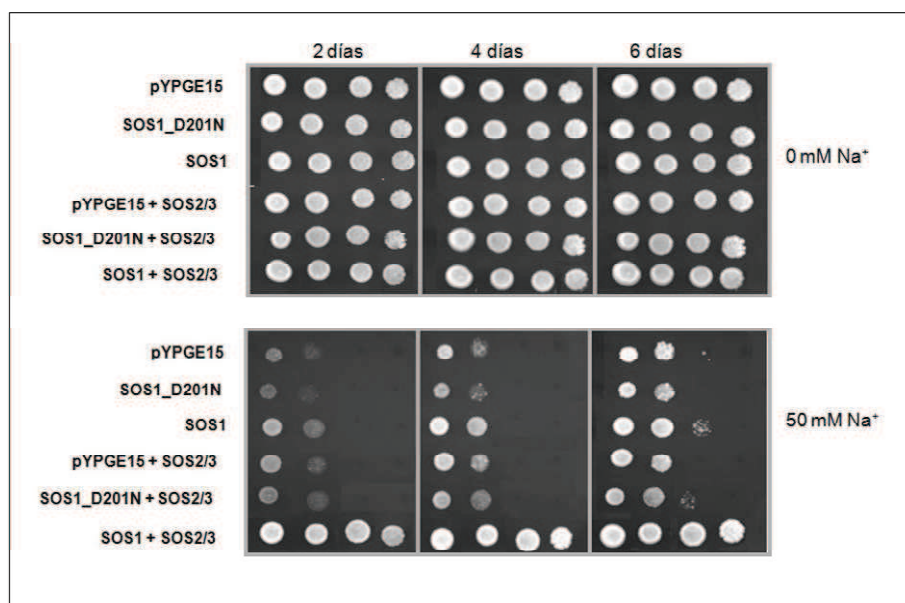




Figura R.1.7. Caracterización funcional del alelo *SOS1\_D201N* en levadura. Transformantes de la cepa de levadura halosensible AXT3K expresando el antiportador mutado *SOS1\_D201N* y el silvestre *SOS1*, en presencia y ausencia del complejo *SOS2/SOS3*, se cultivaron en medio YNB líquido hasta saturación. Se distribuyeron 5 µl de diluciones decimales seriadas en medio AP suplementado con 1 mM de KCl y las concentraciones indicadas de NaCl, y se incubaron a 28 °C. Los plásmidos utilizados para la expresión de las proteínas SOS fueron pYPGE15 para los alelos de *SOS1* y pFL32T para el complejo *SOS2/SOS3*.

#### R.1.2.2. Transformación de la línea *sos1-1* de Arabidopsis con el alelo *SOS1\_D201N*.

Una vez comprobada la incapacidad de la proteína *SOS1\_D201N* para mediar la extrusión de Na<sup>+</sup> en levadura, se procedió a la transformación con el alelo *SOS1\_D201N* del mutante *sos1-1* de Arabidopsis para diseccionar la importancia relativa del transporte de Na<sup>+</sup> en relación con otras funciones reguladoras de la proteína *SOS1* en la célula vegetal que fueran independientes de su función como transportador iónico. Partiendo del fragmento de cDNA mutado y clonado en el vector *Blunt*<sup>®</sup>PCR, se liberó con las enzimas *Xba*I y *Bam*HI la banda de 1.3 kb portadora de la mutación y se sustituyó con ella el fragmento equivalente del cDNA del alelo silvestre de *SOS1* clonado en el vector binario de expresión en Arabidopsis pBI321 (Shi *et al.*, 2000) (ver apartados M.2.6.1. y M.2.6.4.).

El mutante *sos1-1* presenta una delección de 14 pb que produce un fallo temprano en la traducción del antiportador *SOS1* por cambio de fase. Como consecuencia, las plantas mutantes presentan un fenotipo de halosensibilidad severa en condiciones de salinidad moderada (Wu *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002). Este fenotipo puede aliviarse mediante la expresión del transportador silvestre *AtSOS1* e incluso, en menor grado, de su ortólogo en arroz *OsSOS1* (Shi *et al.*, 2000; Martínez-Atienza *et al.*, 2007a). Con el fin de confirmar la funcionalidad del alelo mutante *in planta*, se transformó con él la línea mutante de Arabidopsis *sos1-1*. La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 se transformó con el alelo mutado *SOS1\_D201N*, con *pBIAtSOS1* (Shi *et al.*, 2000) y con el vector pBI321 vacío (usados como control positivo y negativo respectivamente), y se utilizó para infectar plantas de la línea mutante *sos1-1* (ver apartados M.4.2.2. y M.4.4.). Se seleccionaron líneas transgénicas T1 para las distintas construcciones por germinación en MS suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y se confirmó la presencia del transgén por PCR con los oligonucleótidos CaMV35S\_f/SOSDN\_r, que amplifican una banda de 0.65 kb en el extremo aminoterminal del cDNA. Alternativamente, se confirmó el fondo genético *sos1-1* amplificando con los oligonucleótidos *sos1-1\_f/sos1-1\_r*, que permiten distinguir el alelo mutante del alelo silvestre en geles de TBE con agarosa al 2% (Shi *et al.*, 2000) (Figura R.1.8. (c)).

Para asegurar que se estaba produciendo una acumulación significativa del mRNA de *SOS1*, se cuantificó su nivel de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa (Figura R.1.8). Se extrajo el RNA total (ver apartado M.3.1.) de la línea mutante *sos1-1* y de 8 líneas independientes de este mutante transformado con el alelo *SOS1\_D201N* y el cDNA, obtenido mediante la utilización del kit *Quanti Tect Reverse Transcription Kit* (Qiagen), se utilizó como molde en una amplificación con la pareja de oligonucleótidos específicos del transgén

SOS1Xho\_f y NOSTerm\_r (ver apartado M.3.4.). Como control de carga, se amplificó el cDNA también con oligonucleótidos específicos para  $\beta$ -TUBULINA-4 (At5g44340)(TB4-5'/TB4-3'), ya que este gen es de expresión constitutiva en Arabidopsis (Kreps *et al.*, 2002).

Todas las líneas (excepto el control negativo *sos1-1*) mostraron acumulación del transcrito de *SOS1*, demostrando que el transgén *SOS1\_D201N* se expresa en las líneas transgénicas obtenidas.

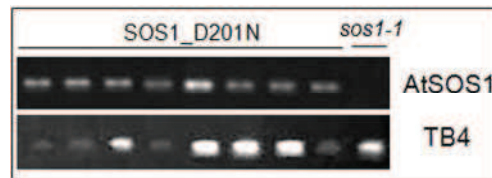


Figura R.1.8. Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de la acumulación del transcrito de *AtSOS1*. Las reacciones RT-PCR se realizaron utilizando una pareja de oligonucleótidos específicos para el cDNA de *SOS1* expresado en el vector pBI321 (*SOS1*Xho/*NOST*r) (panel superior) y otra para el gen de expresión constitutiva  $\beta$ -TUBULINA-4 (TB4-5'/3') (panel inferior). El análisis de la expresión del transgén se realizó con 8 líneas independientes transformadas con el alelo *SOS1\_D201N* y la línea mutante *sos1-1*.

### R.1.2.3. Caracterización funcional del alelo *SOS1\_D201N* frente a salinidad en la línea mutante *sos1-1* de Arabidopsis.

Una vez comprobada la expresión del transgén *SOS1\_D201N*, se realizaron ensayos de halotolerancia mediante la transferencia de plántulas T2 de 7 días, previamente seleccionadas en MS con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, a medio MS normal y suplementado con 75 mM NaCl. A los 7 días, se fotografiaron las placas (Figura R.1.9 (a)) y se midió el crecimiento de las raíces (Figura R.1.9 (b)) (ver apartado M.7.1.). Una vez más, el alelo *SOS1\_D201N* se mostró incapaz de suprimir el fenotipo de halosensibilidad. Ninguna de las 11 líneas independientes evaluadas fue capaz de complementar la mutación *sos1-1*, mostrando todas el mismo fenotipo de halosensibilidad severa que el control transformado con el vector pBI321 vacío. Para descartar una complementación parcial, se repitió el mismo ensayo a concentraciones menores de NaCl (25 y 50 mM NaCl), obteniéndose de nuevo el mismo resultado y demostrando que el ácido aspártico en la posición 201 es esencial para el transporte  $\text{Na}^+$  del antiportador *SOS1* *in planta* (Figura R.1.10).

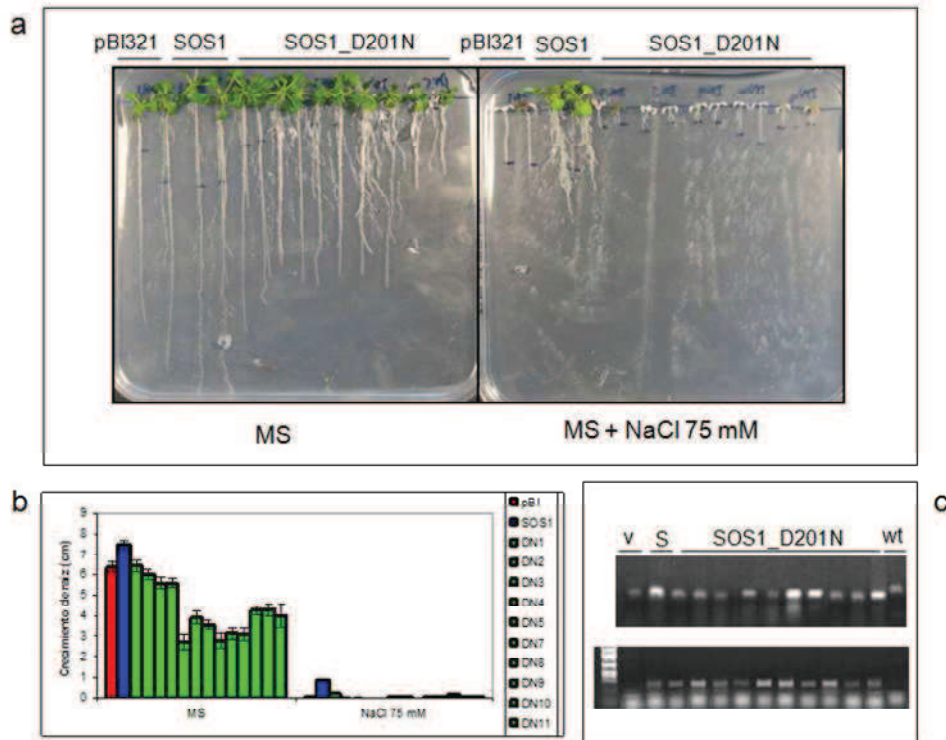


Figura R.1.9. Caracterización funcional del alelo *SOS1\_D201N* en la línea mutante *sos1-1* de *Arabidopsis*. Plántulas de 7 días germinadas en MS suplementado con kanamicina se transfirieron a placas de MS suplementado con NaCl 75 mM, fotografiándose (a) y midiéndose la elongación de la raíz (b) a los 7 días de tratamiento. (a) Izquierda, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el vector pBI321 vacío. Centro, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el alelo silvestre *AtSOS1* bajo el promotor constitutivo 35S. Derecha, cinco líneas independientes de *sos1-1* expresando el alelo mutado *SOS1\_D201N* bajo el control del mismo promotor, mostrándose dos plantas por línea. (b) Elongación de la raíz al final del tratamiento para todas las líneas ensayadas. (c) Genotipado por PCR de las líneas transgénicas. De izquierda a derecha, se muestran las bandas correspondientes a la línea transformada con el vector vacío (v), con el alelo silvestre *SOS1* (S), 10 líneas independientes transformadas con el alelo mutado *SOS1\_D201N* y la línea control Col-0 *g/1* (wt). La amplificación superior permite distinguir entre el alelo *sos1-1* y el alelo silvestre de *SOS1*, mientras que la amplificación inferior detecta la presencia del transgén de *SOS1*.

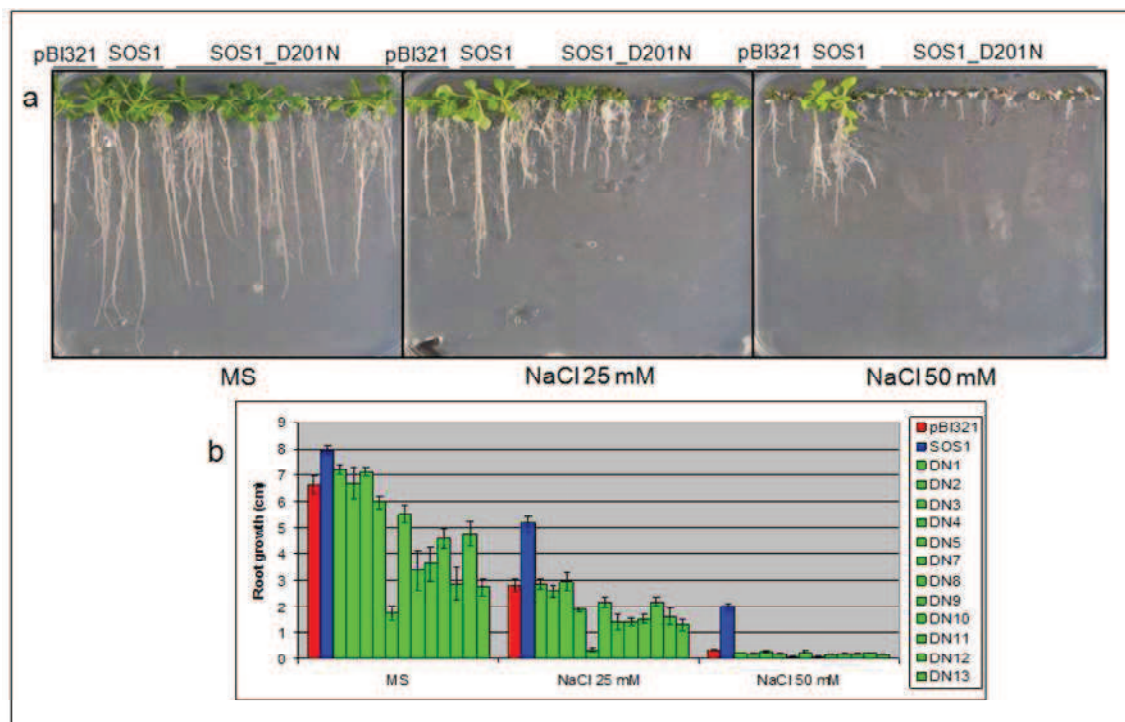


Figura R.1.10. Caracterización funcional a baja concentración de sal de la línea mutante *sos1-1* de *Arabidopsis* transformada con el alelo mutado *SOS1\_D201N*. Plántulas de 7 días germinadas en MS suplementado con kanamicina se transfirieron a placas de MS suplementado con NaCl 25 o 50 mM, fotografiándose (a) y midiéndose la elongación de la raíz (b) a los 7 días de tratamiento. (a) Izquierda, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el vector pBI321 vacío. Centro, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el alelo silvestre *AtSOS1* bajo el promotor constitutivo 35S. Derecha, cinco líneas independientes de *sos1-1* expresando el alelo mutado *SOS1\_D201N* bajo el control del mismo promotor, mostrándose dos plantas por línea. (b) Elongación de la raíz al final del tratamiento para todas las líneas ensayadas.

#### **R.1.2.4. Caracterización funcional del alelo *SOS1\_D201N* frente a estrés oxidativo en la línea mutante *sos1-1* de *Arabidopsis*.**

El estrés salino y otros tipos de estrés abiótico producen ROS, que someten a las plantas a estrés oxidativo (Hasegawa *et al.*, 2000), habiéndose demostrado la participación de la ruta SOS en la detoxificación de este tipo de estrés. SOS2 regula a ENH1, una proteína similar a rubredoxina y localizada en el cloroplasto (Zhu *et al.*, 2007), e interacciona con proteínas de señalización de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como NDPK2, CAT2 y CAT3 (Verslues *et al.*, 2007). Por su parte, SOS1 induce la expresión de ENH1 durante estrés salino (Zhu *et al.*, 2007) e interacciona a través de su extremo carboxiterminal con el regulador transcripcional de estrés oxidativo RCD1, participando en la tolerancia de las plantas a estrés oxidativo (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006).

Además de su extrema halosensibilidad, el mutante *sos1-1* comparte con *rcd1-1* su sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y resistencia a metil viológeno (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). Puesto que estos fenotipos no parecen, a priori, relacionados con su actividad como transportador de Na<sup>+</sup>, se estimó que el alelo mutante *SOS1\_D201N* podría comportarse como el alelo silvestre en relación con el estrés oxidativo, ya que no podía descartarse que SOS1, actuando como transceptor, activara alguna ruta de señalización por este tipo de estrés. Plántulas T2 de 7 días, previamente seleccionadas en MS con 50 µg/ml de kanamicina, se transfirieron a medio MS normal y suplementado con MV 1,5 µM o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM, fotografiándose las placas a los 14 días (Figura R.1.11) (ver apartado M.7.1.).

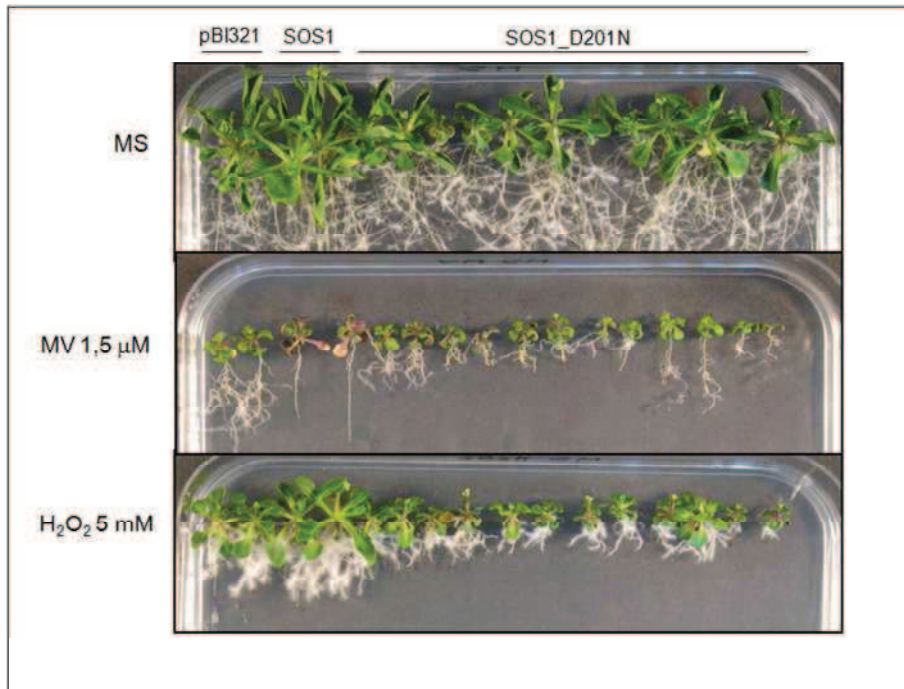


Figura R.1.11. Evaluación fenotípica bajo estrés oxidativo de la línea mutante *sos1-1* de *Arabidopsis* transformada con el alelo *SOS1\_D201N*. Plántulas de 7 días germinadas en MS suplementado con kanamicina se transfirieron a MS suplementado con metil viológeno 1,5  $\mu\text{M}$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM, fotografiándose a los 14 días de tratamiento. Izquierda, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el vector pBI321 vacío. Centro, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el alelo silvestre *AtSOS1* bajo el promotor constitutivo 35S. Derecha, 6 líneas independientes de *sos1-1* expresando el alelo mutado *SOS1\_D201N* bajo el control del mismo promotor, mostrándose dos plantas por línea.

Contrariamente a lo esperado, el alelo *SOS1\_D201N* volvió a comportarse como un mutante nulo en relación con el estrés oxidativo. En el tratamiento con metil viológeno, mientras la línea transformada con el alelo silvestre mostraba acumulación de antocianinas y detención del desarrollo de la raíz, tanto el control negativo transformado con el vector vacío como las líneas transformadas con el alelo mutado mostraban hojas verdes y desarrollo de raíces secundarias. Al tratar con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el desarrollo fue mayor en la línea transformada con el alelo silvestre, mostrando un menor crecimiento tanto las líneas transformadas con el alelo mutado como el control negativo transformado con el vector pBI321 vacío. Los resultados ponen de manifiesto la importancia del ácido aspártico en la posición 201 de *SOS1* también para su función en el estrés oxidativo, que al parecer no sería desencadenada por ninguna cascada de proteínas señalizadoras aguas abajo de *SOS1* sino por su función como transportador de  $\text{Na}^+$ .

## R.2. Búsqueda y expresión de alelos hiperactivos de *SOS1* en *Arabidopsis*.

En la mejora genética de la halotolerancia, con el fin de mantener la homeostasis iónica ante estrés salino, una de las principales estrategias empleadas ha sido la manipulación de genes que codificaban tanto transportadores iónicos como proteínas que los regulaban. Se han obtenido resultados satisfactorios mediante la expresión ectópica de HAL1 y calcineurina (Pardo *et al.*, 1998; Gisbert *et al.*, 2000), así como mediante la sobreexpresión de *AtNHX1*, *SINHX1* o *AVP1* (Aspe *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), si bien estos resultados no siempre se han reproducido en nuestro laboratorio (Leidi *et al.*, 2010; Barragán *et al.*, 2012). La sobreexpresión del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  *SOS1* en *Arabidopsis* también incrementó considerablemente su halotolerancia (Shi *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009).

Con el fin de aislar posibles alelos hiperactivos de *SOS1* y poder extrapolar los resultados a la mejora de la halotolerancia de especies de interés agronómico, se realizó en nuestro laboratorio un rastreo en levadura de una genoteca de alelos mutagenizados al azar del gen *SOS1* de *Arabidopsis*. Además de la mayor rapidez de crecimiento y facilidad de manejo de este organismo, la levadura es un organismo mucho más simple que *Arabidopsis* en el que se observarían más claramente efectos derivados de la simple expresión de *SOS1* sin las interferencias producidas por la compleja maquinaria de regulación de la célula vegetal. El cDNA de *SOS1* se expresó, bajo el control del promotor PGK1, en el vector de expresión en levadura pYPGE15. Para ello, se liberó del vector pSOS1-1 (cDNA de *SOS1* marcado en el extremo carboxiterminal con Hexa-His y clonado en el vector PCR<sup>®</sup>Blunt IITopo) con las enzimas *EcoRV* y *KpnI*, y se clonó en pYPGE15 como fragmento *SmaI/KpnI* (ver apartados M.2.6.1 y M.2.6.4.) La mutagénesis se llevó a cabo mediante la propagación en células competentes de la cepa de *E. coli* XL1-Red (Agilent Technologies) (ver apartado M.2.7.). Esta estirpe carece de los sistemas de reparación de errores ocurridos durante la replicación del DNA, por lo que un alto número de colonias transformadas presentan mutaciones puntuales al azar en el plásmido que contiene el cDNA. Se transformó con esta genoteca la cepa halosensible de levadura AXT3K (Quintero *et al.*, 2002) y se seleccionaron las colonias capaces de crecer en medio AP suplementado con 150 mM de NaCl. Se eligió esta concentración de NaCl porque un alelo silvestre de *SOS1* no confiere suficiente halotolerancia para permitir el crecimiento de las células AXT3K en ese medio, mientras que una proteína *SOS1* activada mediante coexpresión del complejo regulador *SOS2/SOS3* sí lo hace (Quintero *et al.*, 2002). Los plásmidos se rescataron y se secuenciaron los alelos de *SOS1* para identificar las mutaciones.

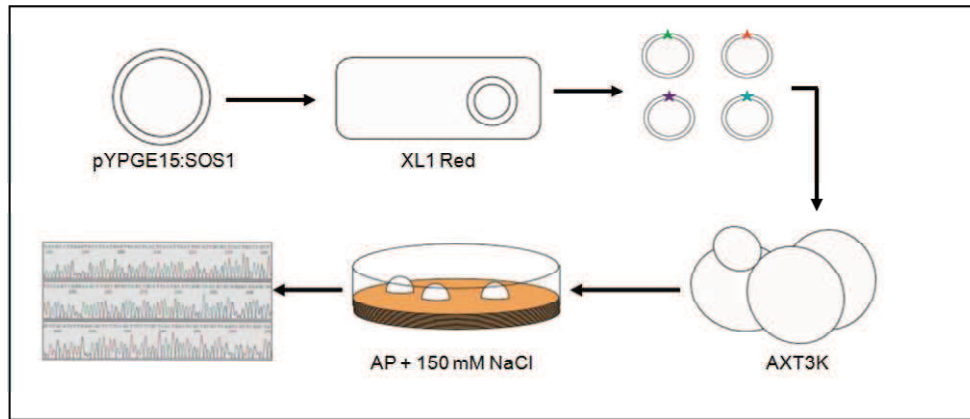


Figura R.2.1. Rastreo de alelos hiperactivos de *SOS1* en levadura. El cDNA de *SOS1* clonado en el vector de expresión en levadura pYPGE15 se propagó en la cepa mutagénica de *E. coli* XL1-Red. Se obtuvo así una genoteca de alelos con mutaciones al azar, que se introdujo en la cepa halosensible de levadura AXT3K. Los transformantes capaces de crecer en medio AP suplementado con 150 mM de NaCl se aislaron y se recuperaron los plásmidos para secuenciarlos.

Los distintos alelos aislados pueden dividirse en dos clases. Los de Clase I (como *SOS1\_A399V* y *SOS1\_E261K*) permiten a la levadura crecer en concentraciones de hasta 400 mM de NaCl y todavía son activados por el complejo *SOS2/SOS3*. Los de Clase II (como *SOS1\_P985S* y *SOS1\_Q998Z*) permiten a la levadura crecer a concentraciones de hasta 800 mM de NaCl, siendo su activación constitutiva e independiente del complejo *SOS2/SOS3* (Quintero *et al.*, 2011).

### R.2.1. Complementación de la mutación *sos1-1* con los alelos mutados.

El sistema de expresión heteróloga en levadura resulta de gran utilidad en la caracterización funcional de genes *in vivo*, debido a la mayor sencillez y rapidez que supone emplear este organismo en ensayos de halotolerancia (Dreyer *et al.*, 1999). Sin embargo, a menudo los fenotipos observados en levadura no son extrapolables a la célula vegetal, ya que la diferencia de componentes celulares entre ambas puede llevar a distintas modificaciones post-transcripcionales o interacciones con otras proteínas que alterarían la función de la proteína estudiada. Por este motivo, se hace necesaria la caracterización de los alelos obtenidos en Arabidopsis.

Una vez secuenciados los alelos hiperactivos obtenidos en el rastreo en levadura (ver apartado M.8.), se seleccionaron cuatro para su expresión *in planta*. De entre los seis alelos de clase I aislados se eligieron *SOS1\_E261K* y *SOS1\_A399V*, que afectan a dos residuos muy conservados, situados presumiblemente en los dominios transmembrana 7 y 11 respectivamente. De entre los cinco alelos de clase II obtenidos, se seleccionaron *SOS1\_Δ998*, que produce una proteína con delección del dominio autoinhibitorio carboxiterminal, y *SOS1\_P985S*, único alelo de clase II sin un codón de parada prematuro en el que la mutación del aminoácido prolina alteraría la estructura secundaria de la proteína, impidiendo presumiblemente su autoinhibición por el dominio carboxiterminal pero sin producir una

proteína truncada (Quintero *et al.*, 2011). Se procedió a continuación al clonado de estos cuatro alelos en el vector de Arabidopsis pBI321, que expresa genes bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Para ello, se liberaron las regiones portadoras de mutaciones y se sustituyó con ellas el mismo fragmento del gen silvestre *SOS1* en el vector binario de expresión pBIAtSOS1 (Shi *et al.*, 2000) (ver apartados M.2.6.1, M.2.5. y M.2.6.4.). Las construcciones *pBI321:SOS1\_A399V* y *pBI321:SOS1\_E261K* se realizaron por sustitución con el fragmento portador de la mutación *XbaI/BamHI* de 1.2 kb. En la construcción *pBI321:SOS1\_P985S* se sustituyó con el fragmento portador de la mutación *XhoI/HpaI* de 0.9 kb. La construcción *pBI321:SOS1 $\Delta$ 998* fue realizada en nuestro laboratorio por la Dra. Juliana Martínez-Atienza. Las tres primeras construcciones se distinguieron del alelo silvestre por secuenciación con oligonucleótidos específicos, mientras que en la última se realizó una digestión diagnóstica con *HindIII*.

En primer lugar, se utilizaron estas construcciones para transformar a la línea mutante de Arabidopsis *sos1-1* mediante la infiltración con la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Se seleccionaron plántulas T1 transgénicas de 7 días por su crecimiento en medios con 50  $\mu$ g/ml kanamicina y se transfirieron a tierra para obtener su descendencia. Se confirmó la presencia del transgén en la T2 por PCR con los oligonucleótidos CaMV35S\_f/SOSDN\_r para amplificar el extremo aminoterminal o con SOS1Xho\_f/NOSTerm\_r para el extremo carboxiterminal, y el fondo genético *sos1-1* amplificando con los oligonucleótidos *sos1-1\_f/sos1-1\_r* (Shi *et al.*, 2000) (Figuras R.2.2 (c) a R.2.5 (c)).

Los ensayos de halotolerancia se realizaron mediante la transferencia de plántulas T2 de 7 días, previamente seleccionadas en MS con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, a medio MS normal y suplementado con 75 mM NaCl. A los 7 días, se fotografiaron las placas (Figuras R.2.2 (a) a R.2.5 (a)) y se midió el crecimiento de las raíces (Figuras R.2.2 (b) a R.2.5 (b)) (ver apartado M.7.1.). En general, los 4 alelos ensayados fueron capaces de complementar la mutación *sos1-1*, indicando su funcionalidad *in planta*, pero no mostraron ninguna capacidad de aumento de la halotolerancia en comparación con el alelo silvestre de *SOS1*.



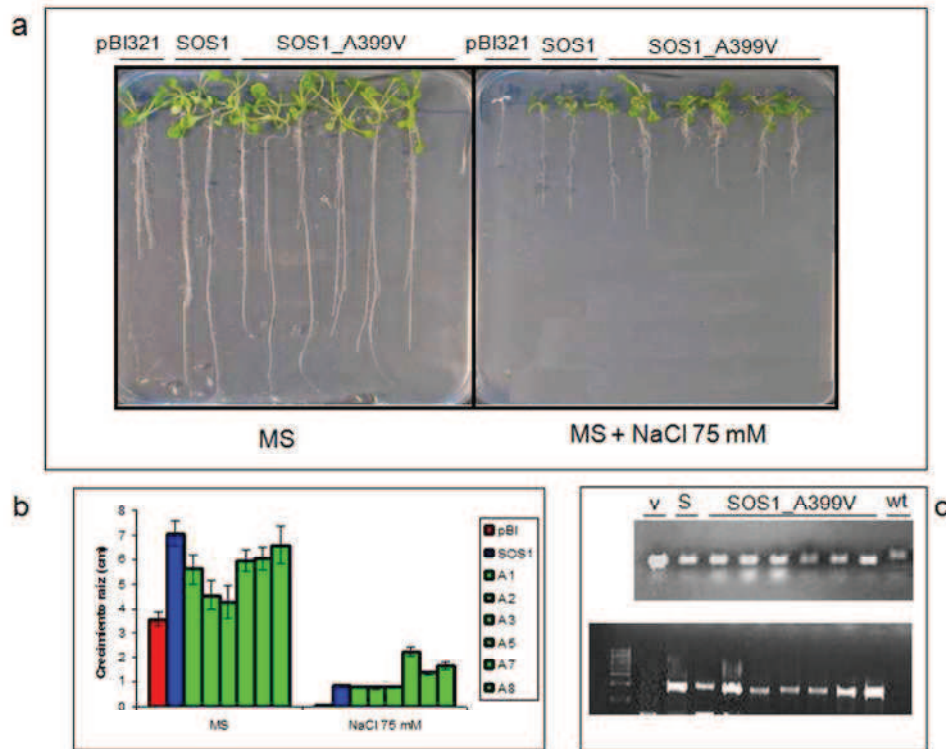


Figura R.2.2. Complementación del mutante de *Arabidopsis sos1-1* con el alelo *SOS1\_A399V*. Plántulas de 7 días germinadas en MS suplementado con kanamicina se transfirieron a placas de MS suplementado con NaCl 75 mM, fotografiándose (a) y midiéndose la elongación de la raíz (b) a los 7 días de tratamiento. (a) Izquierda, una planta de la línea *sos1-1* transformada con el vector pBI321 vacío. Centro, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el alelo silvestre *AtSOS1* bajo el promotor constitutivo 35S. Derecha, tres líneas independientes de *sos1-1* expresando el alelo mutado *SOS1\_A399V* bajo el control del mismo promotor, mostrándose dos plantas por línea al final del tratamiento para todas las líneas ensayadas. (b) Elongación de la raíz al final del tratamiento para todas las líneas ensayadas. (c) Genotipado por PCR de las líneas transgénicas. De izquierda a derecha, se muestran las bandas correspondientes a la línea transformada con el vector vacío (v), con el alelo silvestre *SOS1* (S), 6 líneas independientes transformadas con el alelo mutante *SOS1\_A399V* y la línea control Col-0 *gl1* (wt). La amplificación superior, utilizando los oligonucleótidos *sos1-1\_f* y *sos1-1\_r*, permite distinguir entre el alelo *sos1-1* y el alelo silvestre de *SOS1*, mientras que la amplificación inferior, con los oligonucleótidos *SOS1Xho-f* y *SOSDN-r*, detecta la presencia del transgén de *SOS1*.

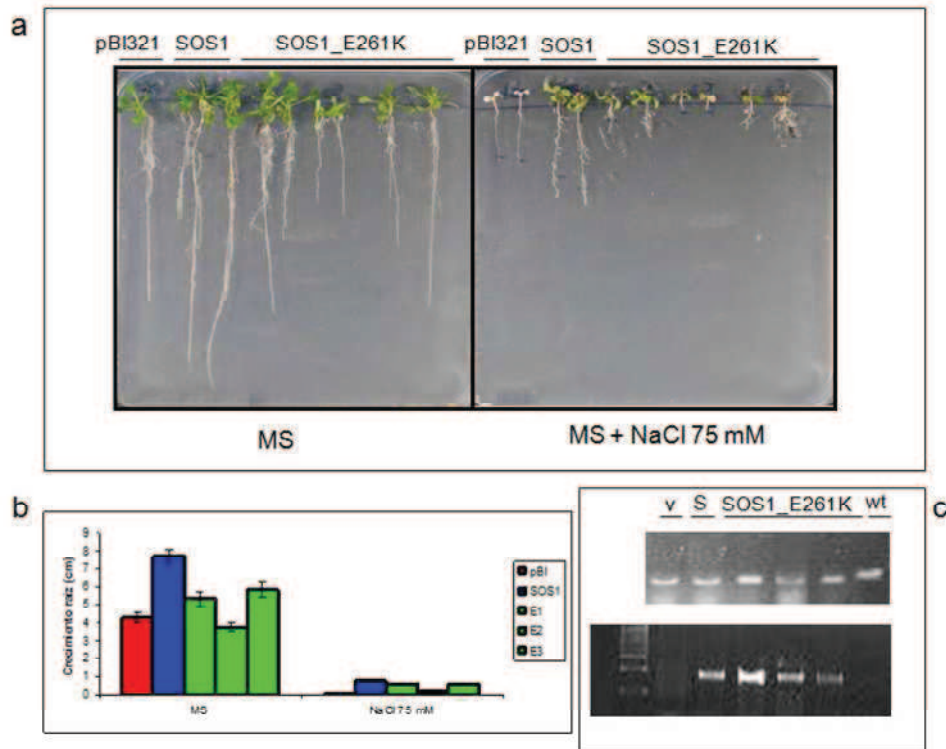


Figura R.2.3. Complementación del mutante de *Arabidopsis sos1-1* con el alelo *SOS1\_E261K*. Plántulas de 7 días germinadas en MS suplementado con kanamicina se transfirieron a placas de MS suplementado con NaCl 75 mM, fotografiándose (a) y midiéndose la elongación de la raíz (b) a los 7 días de tratamiento. (a) Izquierda, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el vector pBI321 vacío. Centro, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el alelo silvestre *AtSOS1* bajo el promotor constitutivo 35S. Derecha, tres líneas independientes de *sos1-1* expresando el alelo mutado *SOS1\_E261K* bajo el control del mismo promotor, mostrándose dos plantas por línea. (b) Elongación de la raíz al final del tratamiento para todas las líneas ensayadas. (c) Genotipado por PCR de las líneas transgénicas. De izquierda a derecha, se muestran las bandas correspondientes a la línea transformada con el vector vacío (v), con el alelo silvestre *SOS1* (S), 3 líneas independientes transformadas con el alelo mutante *SOS1\_E261K* y la línea control Col-0 *gl1* (wt). La amplificación superior, utilizando los oligonucleótidos *sos1-1\_f* y *sos1-1\_r*, permite distinguir entre el alelo *sos1-1* y el alelo silvestre de *SOS1*, mientras que la amplificación inferior, con los oligonucleótidos *SOS1Xho-f* y *SOSDN-r*, detecta la presencia del transgén de *SOS1*.

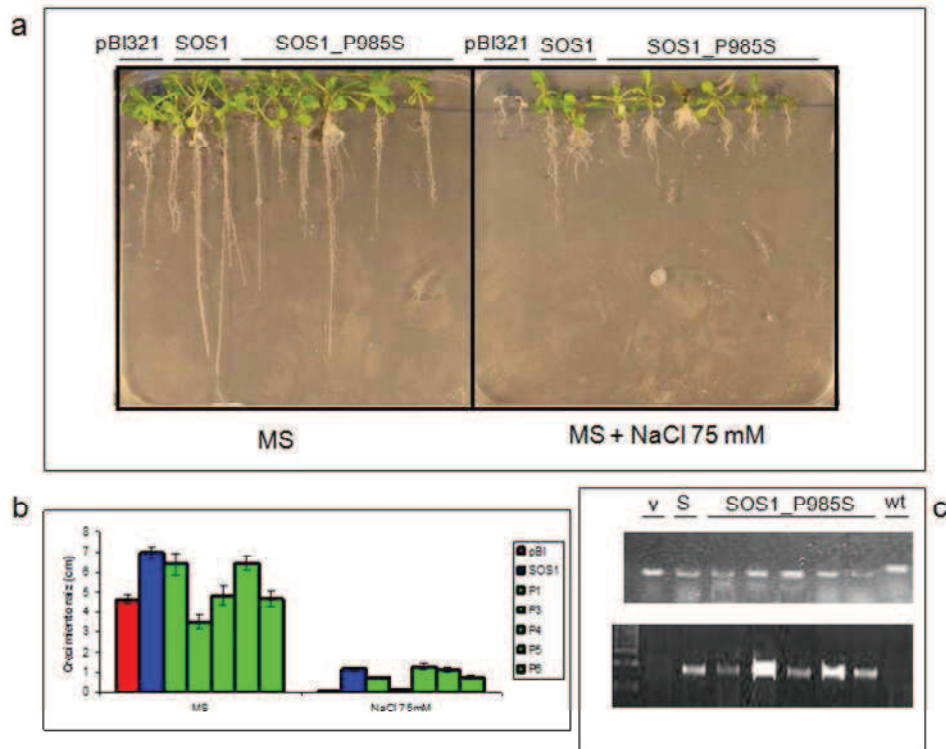


Figura R.2.4. Complementación del mutante de *Arabidopsis sos1-1* con el alelo *SOS1\_P985S*. Plántulas de 7 días germinadas en MS suplementado con kanamicina se transfirieron a placas de MS suplementado con NaCl 75 mM, fotografiándose (a) y midiéndose la elongación de la raíz (b) a los 7 días de tratamiento. (a) Izquierda, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el vector pBI321 vacío. Centro, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el alelo silvestre *AtSOS1* bajo el promotor constitutivo 35S. Derecha, tres líneas independientes de *sos1-1* expresando el alelo mutado *SOS1\_P985S* bajo el control del mismo promotor, mostrándose dos plantas por línea. (b) Elongación de la raíz al final del tratamiento para todas las líneas ensayadas. (c) Genotipado por PCR de las líneas transgénicas. De izquierda a derecha, se muestran las bandas correspondientes a la línea transformada con el vector vacío (v), con el alelo silvestre *SOS1* (S), 5 líneas independientes transformadas con el alelo mutante *SOS1\_P985S* y la línea control Col-0 *gl1* (wt). La amplificación superior, utilizando los oligonucleótidos *sos1-1\_f* y *sos1-1\_r*, permite distinguir entre el alelo *sos1-1* y el alelo silvestre de *SOS1*, mientras que la amplificación inferior, con los oligonucleótidos *SOS1Xho-f* y *SOSDN-r*, detecta la presencia del transgén de *SOS1*.

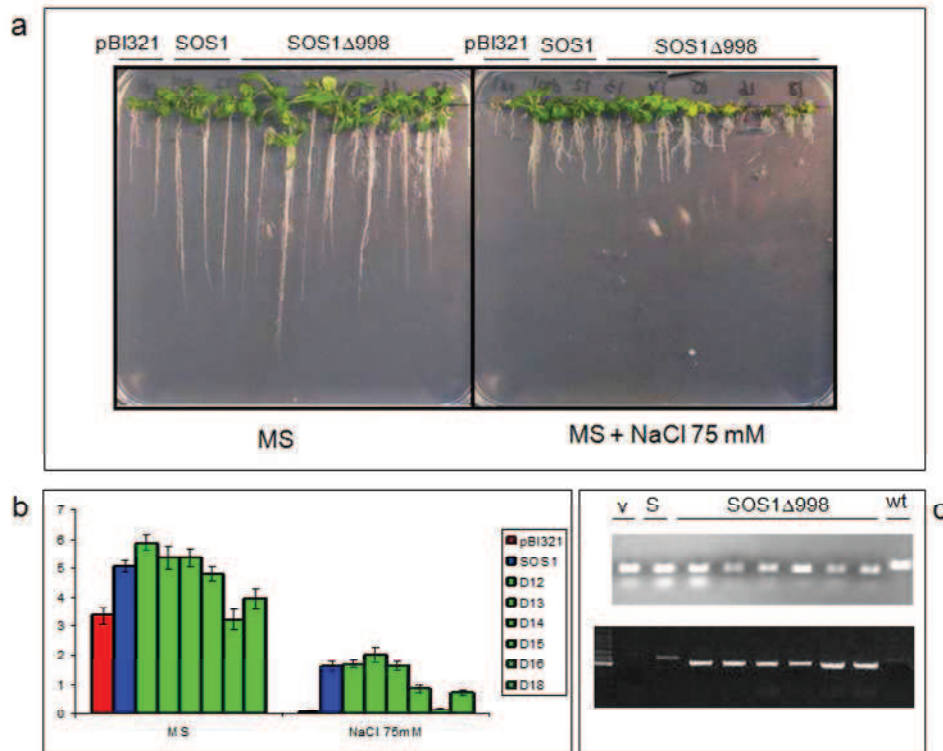


Figura R.2.5. Complementación del mutante de *Arabidopsis sos1-1* con el alelo *SOS1Δ998*. Plántulas de 7 días germinadas en MS suplementado con kanamicina se transfirieron a placas de MS suplementado con NaCl 75 mM, fotografiándose (a) y midiéndose la elongación de la raíz (b) a los 7 días de tratamiento. (a) Izquierda, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el vector pBI321 vacío. Centro, dos plantas de la línea *sos1-1* transformada con el alelo silvestre *AtSOS1* bajo el promotor constitutivo 35S. Derecha, 6 líneas independientes de *sos1-1* expresando el alelo mutado *SOS1Δ998* bajo el control del mismo promotor, mostrándose dos plantas por línea. (b) Elongación de la raíz al final del tratamiento para todas las líneas ensayadas. (c) Genotipado por PCR de las líneas transgénicas. De izquierda a derecha, se muestran las bandas correspondientes a la línea transformada con el vector vacío (v), con el alelo silvestre *SOS1* (S), 6 líneas independientes transformadas con el alelo mutante *SOS1Δ998* y la línea control Col-0 *gl1* (wt). La amplificación superior, utilizando los oligonucleótidos *sos1-1\_f* y *sos1-1\_r*, permite distinguir entre el alelo *sos1-1* y el alelo silvestre de *SOS1*, mientras que la amplificación inferior, con los oligonucleótidos *SOS1Xho-f* y *NOSTerm-r*, detecta la presencia del transgén de *SOS1* completo y truncado.

### R.2.2. Expresión *in vitro* de candidatos a alelos hiperactivos en plantas silvestres de *Arabidopsis*.

Las construcciones presentadas en el apartado R.2.1, una vez confirmada su funcionalidad *in planta*, se utilizaron para transformar plantas de la línea silvestre de *Arabidopsis Col-0 gl1* y determinar si la sobreexpresión de dichos alelos producía un aumento en la halotolerancia superior al aportado por el alelo silvestre. De nuevo, se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 para la agroinfiltración de plantas y se seleccionaron líneas transgénicas T1 para las distintas construcciones por germinación en MS suplementado con 50 µg/ml de kanamicina. La presencia del transgén y el fondo genético silvestre se comprobaron utilizando los oligonucleótidos descritos en el apartado anterior (Figuras R.2.6(c) a R.2.9 (c)).

Dada la imposibilidad de encontrar diferencias en halotolerancia incluso entre los controles midiendo la elongación de la raíz a cualquier concentración de NaCl utilizada y la dificultad de hacerlo por germinación en medio con sal o por irrigación de plantas en suelo (Shi

*et al.*, 2003) (datos no mostrados), se utilizó el procedimiento descrito por Yang *et al.* (2009), consistente en transferir plántulas homocigotas T3 de 6 días germinadas en MS sólido a medio MS líquido normal o suplementado con NaCl 200 mM e incubar en agitación durante 7 días. La halotolerancia se midió indirectamente, cuantificando el nivel de clorofila según se describe en Lichtenthaler (1987) (Figuras R.2.6 (b) a R.2.9 (b)) (ver apartados M.7.2. y M.7.3.).

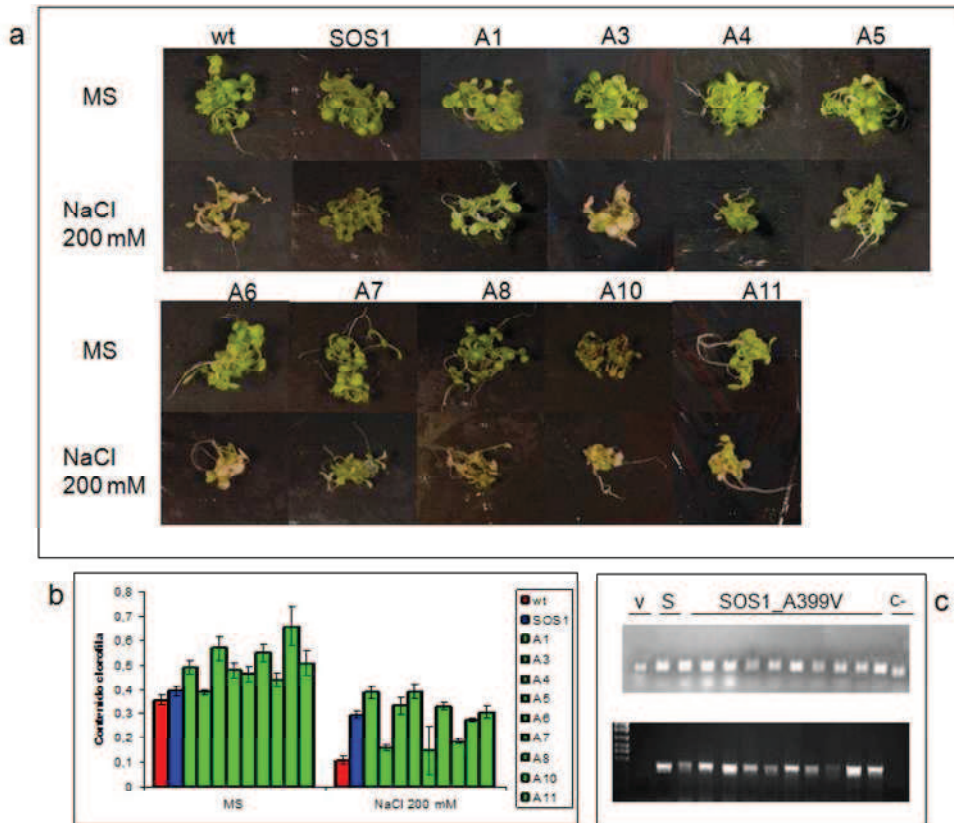


Figura R.2.6. Sobreexpresión del alelo *SOS1\_A399V* en la línea silvestre Col-0 *gl1*. Plantas de 6 días germinadas en MS se transfirieron a matraces con MS líquido, normal y suplementado con NaCl 200 mM. A los 7 días, se fotografiaron las plantas (a), se pesaron en grupos de 6-10 y se extrajo la clorofila añadiendo 1 ml de acetona al 80%. A las 24 horas, se determinó el contenido en clorofila (b) midiendo la absorbancia a 646 y 663 nm en un espectrofotómetro. (c) Genotipado por PCR de las líneas transgénicas. De izquierda a derecha, se muestran las bandas correspondientes a la línea transformada con el vector vacío (v), con el alelo silvestre *SOS1* (S), 10 líneas independientes transformadas con el alelo mutado *SOS1\_A399V* y la línea mutante *sos1-1* (c-). La amplificación superior, utilizando los oligonucleótidos *sos1-1\_f* y *sos1-1\_r*, permite distinguir entre el alelo *sos1-1* y el alelo silvestre de *SOS1*, mientras que la amplificación inferior, con los oligonucleótidos CaMV35S-f y SOSDN-r, detecta la presencia del transgén de *SOS1*.

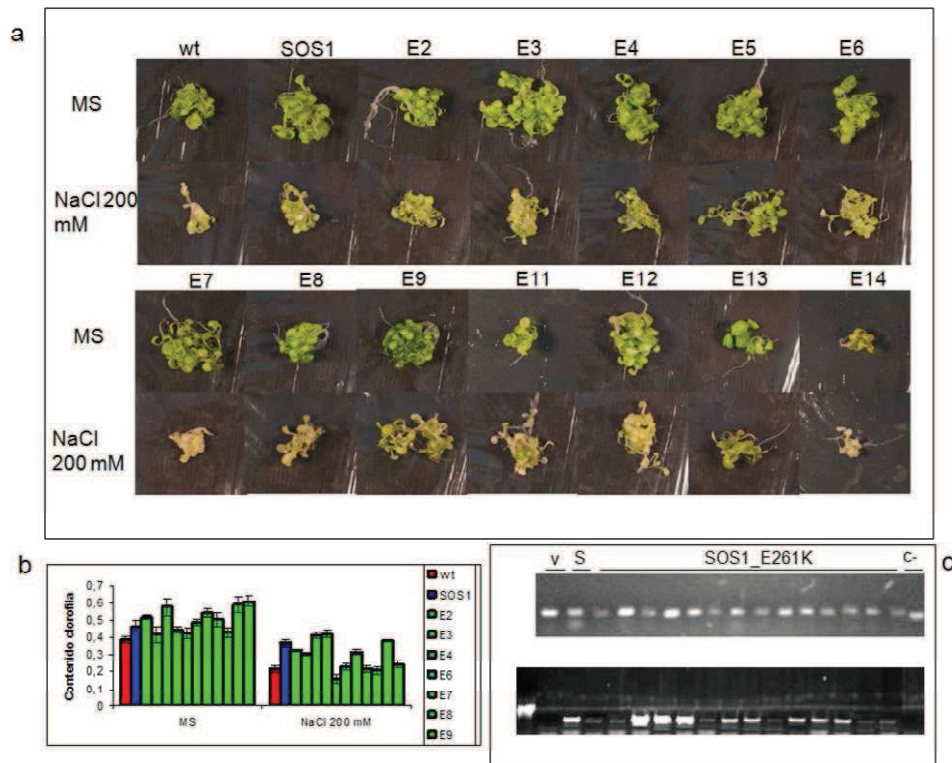


Figura R.2.7. Sobreexpresión del alelo *SOS1\_E261K* en la línea silvestre Col-0 *gl1*. Plantas de 6 días germinadas en MS se transfirieron a matraces con MS líquido, normal y suplementado con NaCl 200 mM. A los 7 días, se fotografiaron las plantas (a), se pesaron en grupos de 6-10 y se extrajo la clorofila añadiendo 1 ml de acetona al 80%. A las 24 horas, se determinó el contenido en clorofila (b) midiendo la absorbancia a 646 y 663 nm en un espectrofotómetro. (c) Genotipado por PCR de las líneas transgénicas. De izquierda a derecha, se muestran las bandas correspondientes a la línea transformada con el vector vacío (v), con el alelo silvestre *SOS1* (S), 14 líneas independientes transformadas con el alelo mutado *SOS1\_E261K* y la línea mutante *sos1-1* (c-). La amplificación superior, utilizando los oligonucleótidos *sos1-1\_f* y *sos1-1\_r*, permite distinguir entre el alelo *sos1-1* y el alelo silvestre de *SOS1*, mientras que la amplificación inferior, con los oligonucleótidos CaMV35S-f y *SOSDN-r*, detecta la presencia del transgén de *SOS1*.

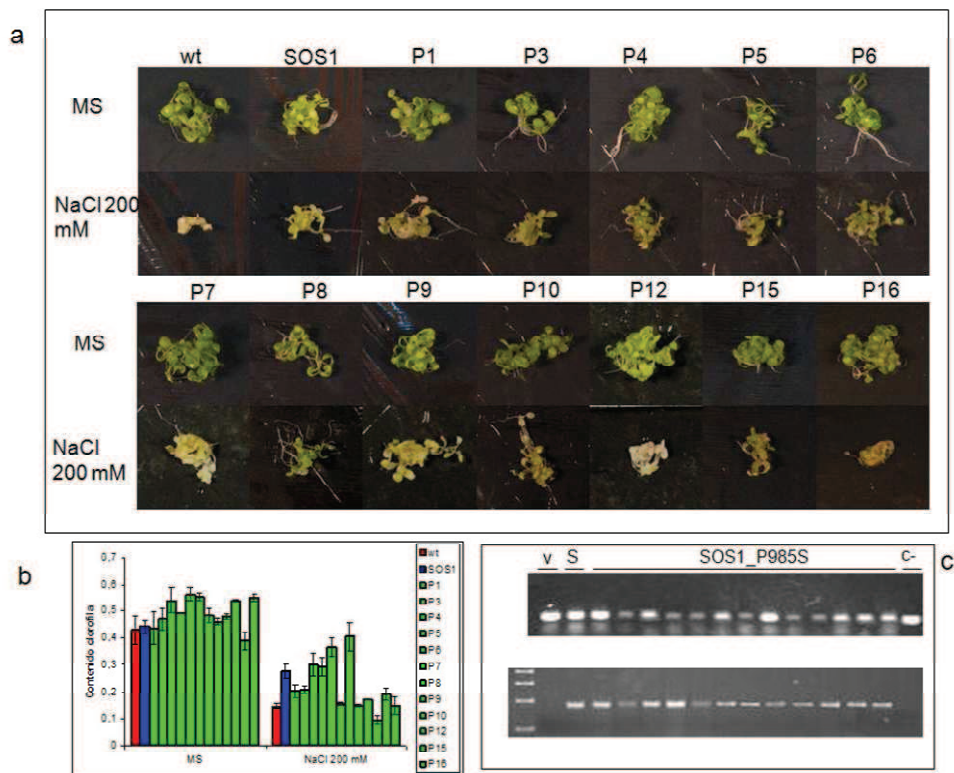


Figura R.2.8. Sobreexpresión del alelo *SOS1\_P985S* en la línea silvestre Col-0 *gl1*. Plantas de 6 días germinadas en MS se transfirieron a matraces con MS líquido, normal y suplementado con NaCl 200 mM. A los 6 días, se fotografiaron las plantas (a), se pesaron en grupos de 6-10 y se extrajo la clorofila añadiendo 1 ml de acetona al 80%. A las 24 horas, se determinó el contenido en clorofila (b) midiendo la absorbancia a 646 y 663 nm en un espectrofotómetro. (c) Genotipado por PCR de las líneas transgénicas. De izquierda a derecha, se muestran las bandas correspondientes a la línea transformada con el vector vacío (v), con el alelo silvestre *SOS1* (S), 13 líneas independientes transformadas con el alelo mutado *SOS1\_P985S* y la línea mutante *sos1-1* (c-). La amplificación superior, usando los oligonucleótidos *sos1-1\_f* y *sos1-1\_r*, permite distinguir entre el alelo *sos1-1* y el alelo silvestre de *SOS1*, mientras que la amplificación inferior, con los oligonucleótidos CaMV35S-f y SOSDN-r, detecta la presencia del transgén de *SOS1*.

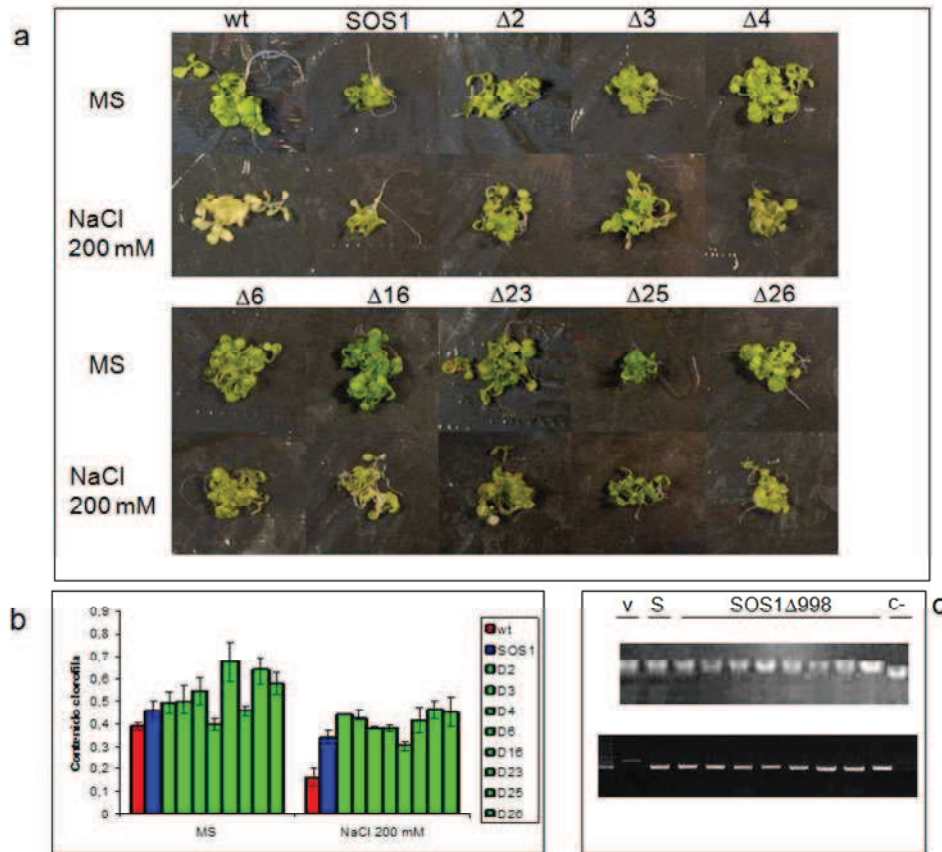


Figura R.2.9. Sobreexpresión del alelo *SOS1 $\Delta$ 998* en la línea silvestre Col-0 *gl1*. Plantas de 6 días germinadas en MS se transfirieron a matraces con MS líquido, normal y suplementado con NaCl 200 mM. A los 6 días, se fotografiaron las plantas (a), se pesaron en grupos de 6-10 y se extrajo la clorofila añadiendo 1 ml de acetona al 80%. A las 24 horas, se determinó el contenido en clorofila (b) midiendo la absorbancia a 646 y 663 nm en un espectrofotómetro. (c) Genotipado por PCR de las líneas transgénicas. De izquierda a derecha, se muestran las bandas correspondientes a la línea transformada con el vector vacío (v), con el alelo silvestre *SOS1* (S), 8 líneas independientes transformadas con el alelo mutado *SOS1 $\Delta$ 998* y la línea mutante *sos1-1* (c-). La amplificación superior, utilizando los oligonucleótidos *sos1-1\_f* y *sos1-1\_r*, permite distinguir entre el alelo *sos1-1* y el alelo silvestre de *SOS1*, mientras que la amplificación inferior, con los oligonucleótidos *SOS1Xho-f* y *NOSTerm-r*, detecta la presencia del transgén de *SOS1* completo y truncado.

Los fenotipos obtenidos en levadura no se reprodujeron en planta. Los alelos *SOS1\_A399V*, *SOS1\_E261K* y *SOS1\_P985S* sólo fueron capaces de aportar un grado de halotolerancia mayor que el conferido por la sobreexpresión del alelo silvestre *SOS1* en 2 de 9, 3 de 11 y 2 de 12 líneas evaluadas respectivamente. Como ya se ha indicado anteriormente, la expresión de proteínas en sistemas heterólogos ofrece muchas ventajas por su mayor rapidez y comodidad, si bien factores como el distinto nivel de expresión génica, o la alteración en regulaciones post-transcripcionales o post-traduccionales debida a la falta en el sistema heterólogo de proteínas reguladoras (activadores, inhibidores, factores de transcripción...)

producen a menudo diferentes niveles de actividad. Además, mientras la levadura es un organismo unicelular, la planta presenta una mayor complejidad ya que posee tejidos diferenciados a nivel tanto morfológico como funcional. Sólo el alelo con la delección en su extremo carboxiterminal, *SOS1\_Δ1998*, produjo una ligera mejora en el fenotipo en 6 de 9 líneas evaluadas, si bien el efecto es sustancialmente menor que el observado en levadura. Este alelo truncado carece del extremo carboxiterminal que, en la proteína completa, constituye un dominio autoinhibitorio que mantiene al antiportador en un estado inactivo. La delección del extremo carboxiterminal mantendría a *SOS1* constitutivamente activa, requiriéndose para la activación de la proteína completa la fosforilación mediante el complejo *SOS2/SOS3* de la serina en la posición 1138 y siendo necesaria también la presencia de la serina que ocupa la posición 1136 (Pardo *et al.*, 2006; Quintero *et al.*, 2011).

El  $\text{Li}^+$  se usa habitualmente en el laboratorio como catión tóxico análogo al  $\text{Na}^+$ , con el que comparte muchos sistemas de transporte y dianas, ya que debido a su alta toxicidad se puede añadir a los medios de cultivo en concentraciones tan bajas que no causen estrés osmótico a la planta (Serrano *et al.*, 1999; Nublat *et al.*, 2001). Aunque numerosos ensayos de transporte demuestran que la proteína *SOS1* es un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  con poca afinidad por otros cationes monovalentes como  $\text{K}^+$  o  $\text{Li}^+$  (Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002), el mutante *sos1-1* muestra también cierto grado de sensibilidad a este último catión (Wu *et al.*, 1996). Muchos antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  filogenéticamente emparentados con *SOS1* presentan distintos grados de afinidad por  $\text{Li}^+$  como NhaP de *Synechocystis*, *Aphanotece halophytica* y *Saccharomyces cerevisiae*, Cnh1p de *Candida albicans*, Sod2-p de *Zygosaccharomyces rouxii* y *Schizosaccharomyces pombe*, NHE de glóbulos rojos de mamíferos o NHX8 de *Arabidopsis*, homóloga a *SOS1* en un 72%, siendo la presencia de ciertos dominios y aminoácidos determinante en su especificidad iónica (Hamada *et al.*, 2001; Waditee *et al.*, 2001; Kinclová *et al.*, 2002; Dunham *et al.*, 2005; An *et al.*, 2007). En nuestro laboratorio se han clonado los genes homólogos al antiportador *SOS1* de *Arabidopsis* en arroz y trigo duro. Aunque la sensibilidad a  $\text{Na}^+$  de la línea *sos1-1* de *Arabidopsis* no pudo ser suprimida por el homólogo *SOS1* de trigo duro y lo fue sólo parcialmente por el de arroz, ambas proteínas fueron capaces de suprimir su sensibilidad a  $\text{Li}^+$  (Martínez-Atienza *et al.*, 2007a; Feki *et al.*, 2011; Quintero *et al.*, sin publicar). A la vista de estos precedentes, se postuló que el comportamiento similar al alelo silvestre de la mayoría de alelos evaluados en planta frente a  $\text{Na}^+$  podría deberse a que se habían seleccionado alelos tolerantes a estrés osmótico, ya que la aplicación de altas concentraciones de  $\text{NaCl}$  conlleva la imposición de este tipo de estrés además del iónico. Para comprobar esta hipótesis, se decidió estudiar la tolerancia de las líneas transgénicas frente a  $\text{Li}^+$ , ya que permite discriminar entre ambos componentes del estrés salino.

Semillas T3 homocigotas de las distintas líneas transformadas con cada uno de los 4 alelos se sembraron en medio MS sólido normal o suplementado con  $\text{LiCl}$  30 mM, fotografiándose las plántulas a los 7 días (Figuras R.2.10 a R.2.13). Varias líneas independientes de los 4 alelos mostraron una mayor germinación que el control positivo, destacando el mejor comportamiento de los alelos de clase I (4 de 7 líneas en *SOS1\_A399V* y



8 de 12 en *SOS1\_E261K*) frente a los de clase II (4 de 10 líneas en *SOS1\_P985S* y 4 de 9 en *SOS1Δ998*).

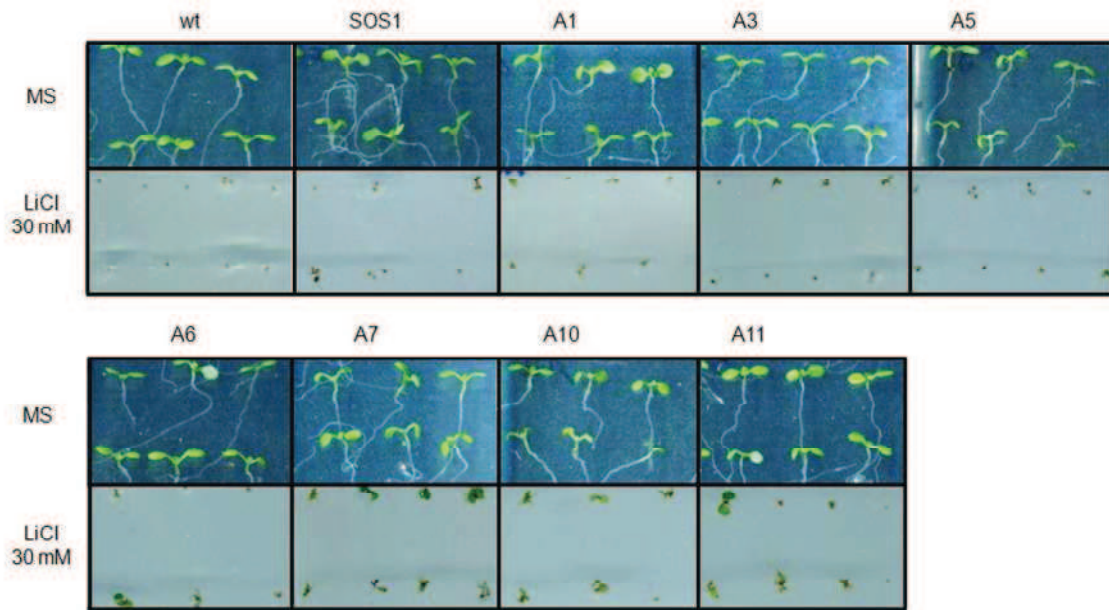


Figura R.2.10. Germinación de líneas sobreexpresando el alelo *SOS1\_A399V* en LiCl. Semillas de las distintas líneas de Col-0 *g1* transformadas con el alelo mutante *SOS1\_A399V* se sembraron en medio MS normal y suplementado con LiCl 30 mM, fotografiándose a los 7 días.

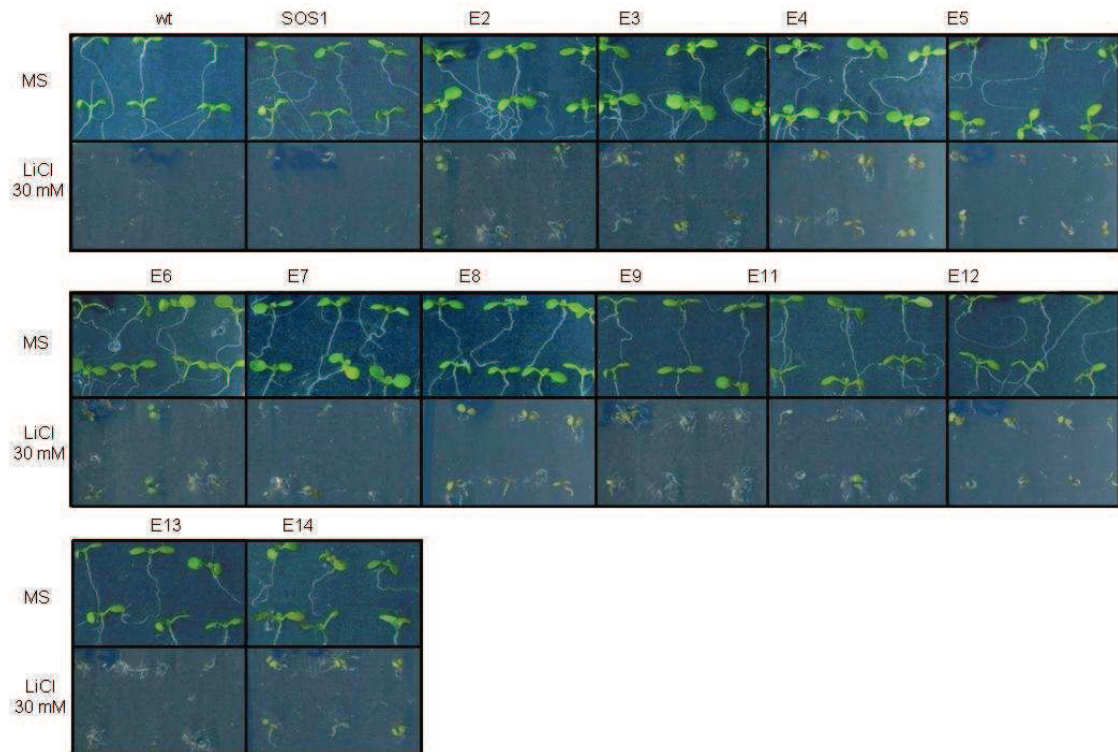


Figura R.2.11. Germinación de líneas sobreexpresando el alelo *SOS1\_E261K* en LiCl. Semillas de las distintas líneas de Col-0 *g1* transformadas con el alelo mutante *SOS1\_E261K* se sembraron en medio MS normal y suplementado con LiCl 30 mM, fotografiándose a los 7 días.

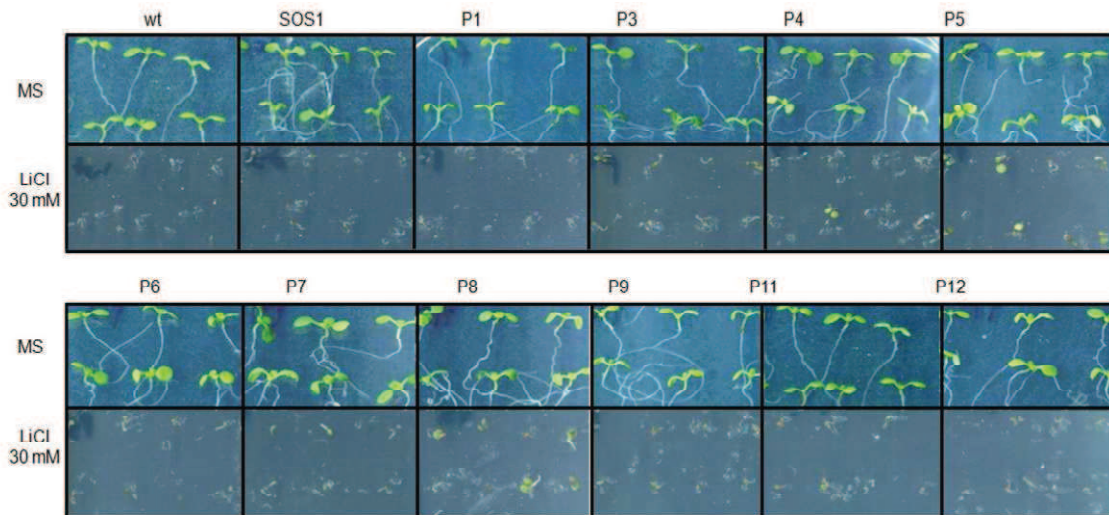


Figura R.2.12. Germinación de líneas sobreexpresando el alelo *SOS1\_P985S* en LiCl. Semillas de las distintas líneas de Col-0 *g1* transformadas con el alelo mutante *SOS1\_P985S* se sembraron en medio MS normal y suplementado con LiCl 30 mM, fotografiándose a los 7 días.

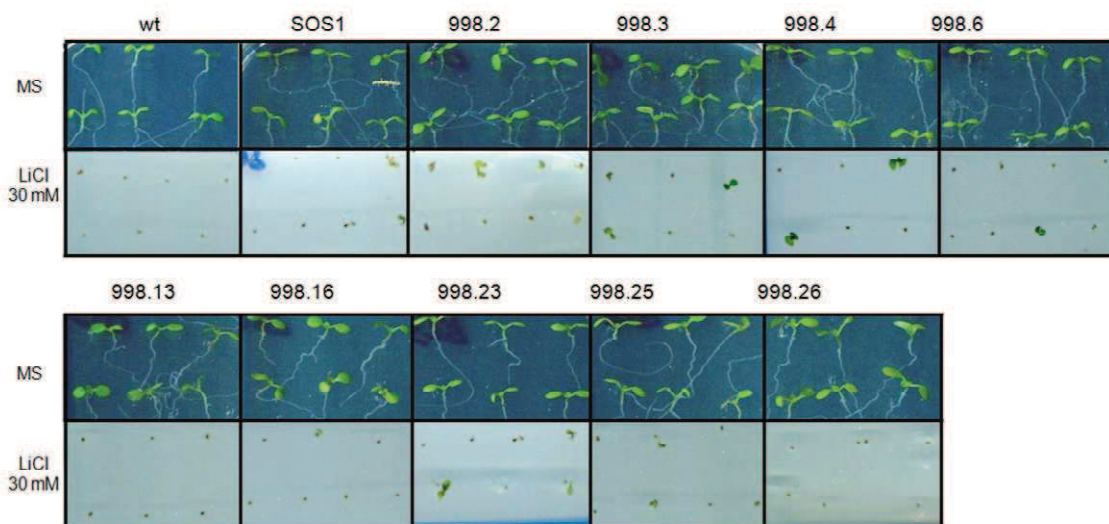


Figura R.2.13. Germinación de líneas sobreexpresando el alelo *SOS1Δ998* en LiCl. Semillas de las distintas líneas de Col-0 *g1* transformadas con el alelo mutante *SOS1Δ998* se sembraron en medio MS normal y suplementado con LiCl 30 mM, fotografiándose a los 7 días.

Alternativamente, plántulas homocigotas T3 de 7 días germinadas en MS sólido fueron transferidas a medio MS líquido normal o suplementado con 30 mM LiCl y se incubaron en agitación durante 10 días. La tolerancia a  $\text{Li}^+$  se midió de la misma manera que en el caso del  $\text{Na}^+$ , es decir, cuantificando el nivel de clorofila según se describe en Lichtenthaler (1987) (ver apartados M.7.2. y M.7.3.). (Figuras R.2.14 (a) y (b) a R.2.17 (a) y (b)). Las líneas transformadas con los 4 alelos mutantes mostraron una tolerancia a  $\text{Li}^+$  mayor que el control positivo transformado con el alelo silvestre en 4 de 7 líneas de *SOS1\_A399V*, 7 de 12 líneas de *SOS1\_E261K*, 6 de 13 líneas de *SOS1\_P985S* y 5 de 9 líneas de *SOS1\_Δ998*. Si comparamos la tolerancia a ambos cationes en las distintas líneas independientes, vemos que varias de las

que mostraron una mayor tolerancia a  $\text{Na}^+$  también la presentaron frente a  $\text{Li}^+$  (como A399V.5, E261K.4 y 13 ó  $\Delta$ 998.3 y 23), al igual que varias mostraron sensibilidad a ambos cationes (como A399V.3 y 6, E261K.4 y 13, P985S.7 y 12 ó  $\Delta$ 998.13). Puesto que en general los alelos hiperactivos de *SOS1* fueron más resistentes a  $\text{Li}^+$  que a  $\text{Na}^+$ , era predecible encontrar casos en los que líneas con baja tolerancia a  $\text{Na}^+$  mostraran una resistencia a  $\text{Li}^+$  mayor que la del control positivo (como A399V.10 y 11, E261K.5, 10 y 11 o P985S.4, 5, 9 y 10), mientras que resultaron sorprendentes unos pocos casos de líneas cuya elevada tolerancia a  $\text{Na}^+$  no se repitió frente a  $\text{Li}^+$  ( $\Delta$ 998.26 y E261K.5).

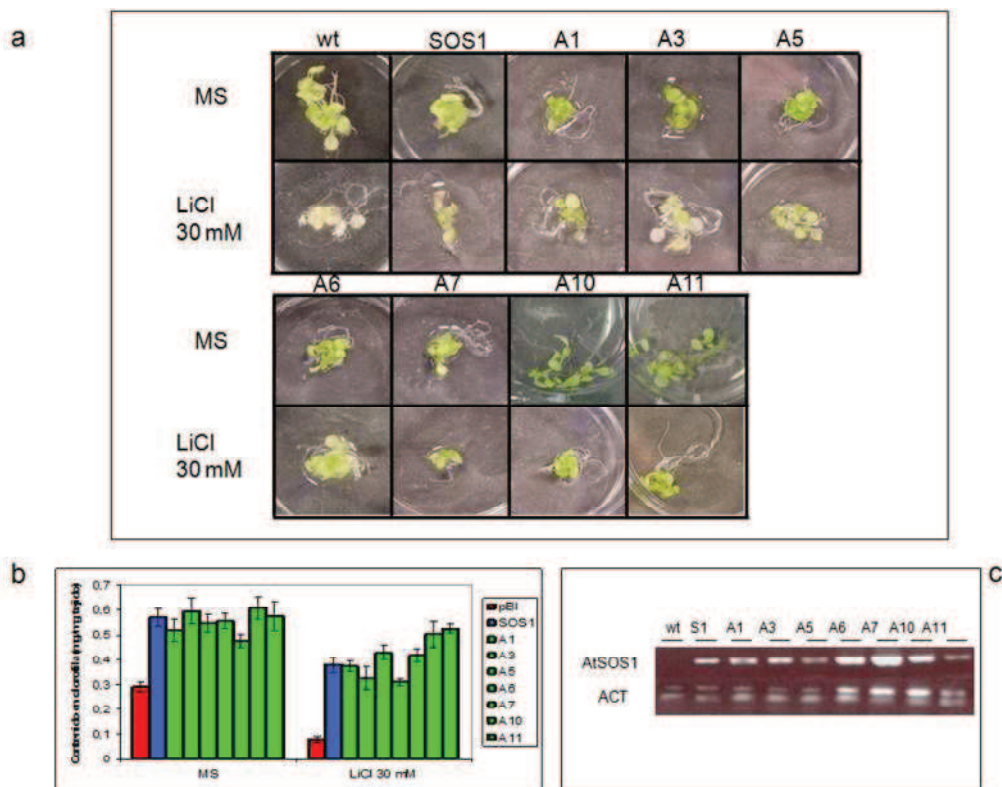


Figura R.2.14. Tratamiento con LiCl en líneas transformadas con el alelo *SOS1\_A399V* en el fondo silvestre Col-0 *g1*. Plantas de 7 días germinadas en MS se transfirieron a placas con MS líquido, normal y suplementado con LiCl 30 mM. A los 10 días, se fotografiaron las plantas (a), se pesaron en grupos de 6-10 y se extrajo la clorofila añadiendo 1 ml de acetona al 80%. A las 24 horas, se determinó el contenido en clorofila (b) midiendo la absorbancia a 646 y 663 nm en un espectrofotómetro. (c) Cuantificación de la acumulación del transcrito de *AtSOS1* mediante RT-PCR semicuantitativa. Las reacciones RT-PCR se realizaron utilizando una pareja de oligonucleótidos específicos para el cDNA de *SOS1* expresado en el vector pBI321 (998-BamHI/NOSTr) (panel superior) y otra para el gen de expresión constitutiva *ACTINA* (*ACTf/ACTr*) (panel inferior). El análisis de la expresión del transgén se realizó con 7 líneas independientes transformadas con el alelo mutante *SOS1\_A399V*, utilizándose la línea silvestre Col-0 *g1* sin transformar o sobreexpresando *SOS1* como controles negativo y positivo respectivamente.

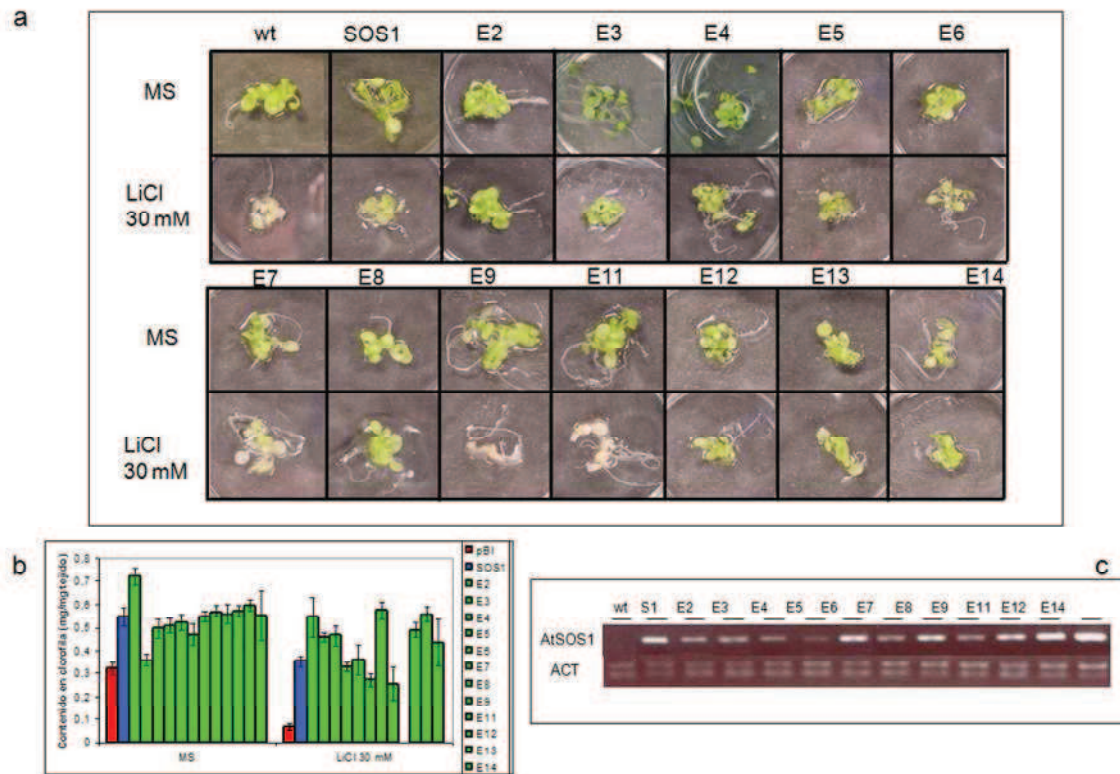


Figura R.2.15. Tratamiento con LiCl en líneas transformadas con el alelo *SOS1\_E261K* en el fondo silvestre Col-0 *g1*. Plantas de 7 días germinadas en MS se transfirieron a placas con MS líquido, normal y suplementado con LiCl 30 mM. A los 10 días, se fotografiaron las plantas (a), se pesaron en grupos de 6-10 y se extrajo la clorofila añadiendo 1 ml de acetona al 80%. A las 24 horas, se determinó el contenido en clorofila (b) midiendo la absorbancia a 646 y 663 nm en un espectrofotómetro. (c) Cuantificación de la acumulación del transcrito de *AtSOS1* mediante RT-PCR semicuantitativa. Las reacciones RT-PCR se realizaron utilizando una pareja de oligonucleótidos específicos para el cDNA de *SOS1* expresado en el vector pBI321 (998-BamH1f/NOSTr) (panel superior) y otra para el gen de expresión constitutiva *ACT1NA* (ACTf/ACTr)(panel inferior). El análisis de la expresión del transgén se realizó con 11 líneas independientes transformadas con el alelo mutante *SOS1\_E261K*, utilizándose la línea silvestre Col-0 *g1* sin transformar o sobreexpresando *SOS1* como controles negativo y positivo respectivamente.

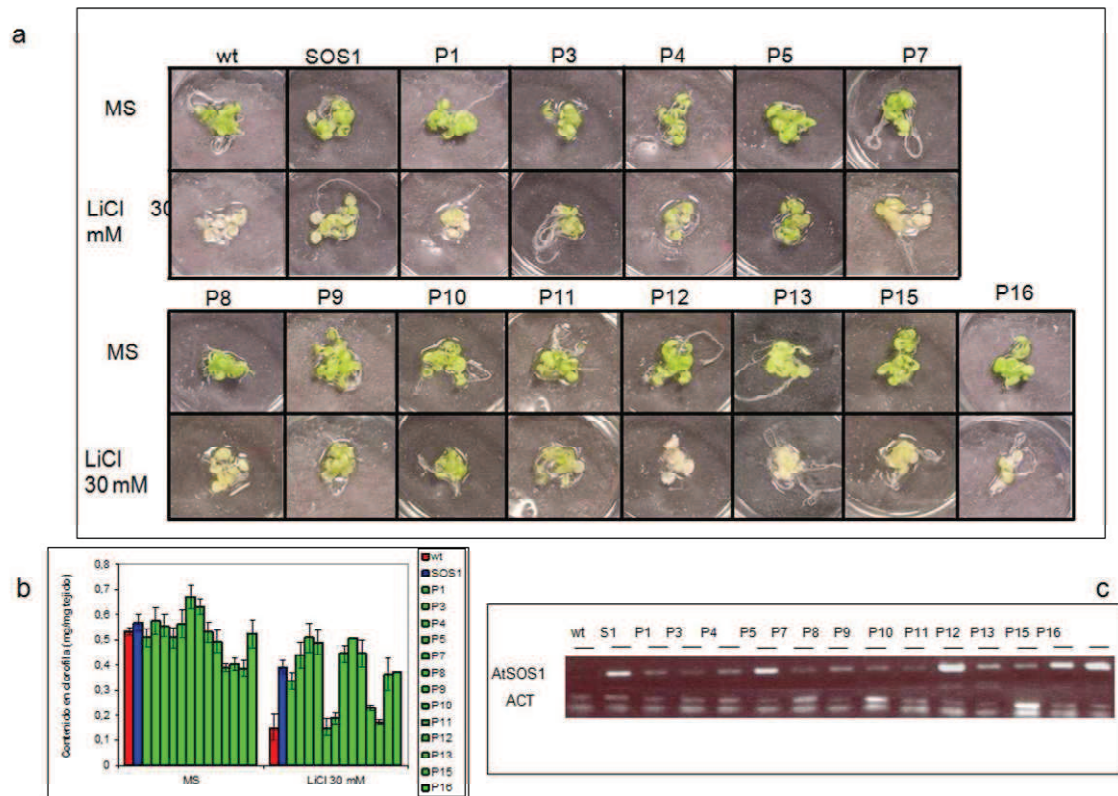


Figura R.2.16. Tratamiento con LiCl en líneas transformadas con el alelo *SOS1\_P985S* en el fondo silvestre Col-0 *gl1*. Plantas de 7 días germinadas en MS se transfirieron a placas con MS líquido, normal y suplementado con LiCl 30 mM. A los 10 días, se fotografiaron las plantas (a), se pesaron en grupos de 6-10 y se extrajo la clorofila añadiendo 1 ml de acetona al 80%. A las 24 horas, se determinó el contenido en clorofila (b) midiendo la absorbancia a 646 y 663 nm en un espectrofotómetro. (c) Cuantificación de la acumulación del transcrito de *AtSOS1* mediante RT-PCR semicuantitativa. Las reacciones RT-PCR se realizaron utilizando una pareja de oligonucleótidos específicos para el cDNA de *SOS1* expresado en el vector pBI321 (998-BamHlf/NOSTr) (panel superior) y otra para el gen de expresión constitutiva *ACT1NA* (*ACTf/ACTr*) (panel inferior). El análisis de la expresión del transgén se realizó con 13 líneas independientes transformadas con el alelo mutante *SOS1\_P985S*, utilizándose la línea silvestre Col-0 *gl1* sin transformar o sobreexpresando *SOS1* como controles negativo y positivo respectivamente.

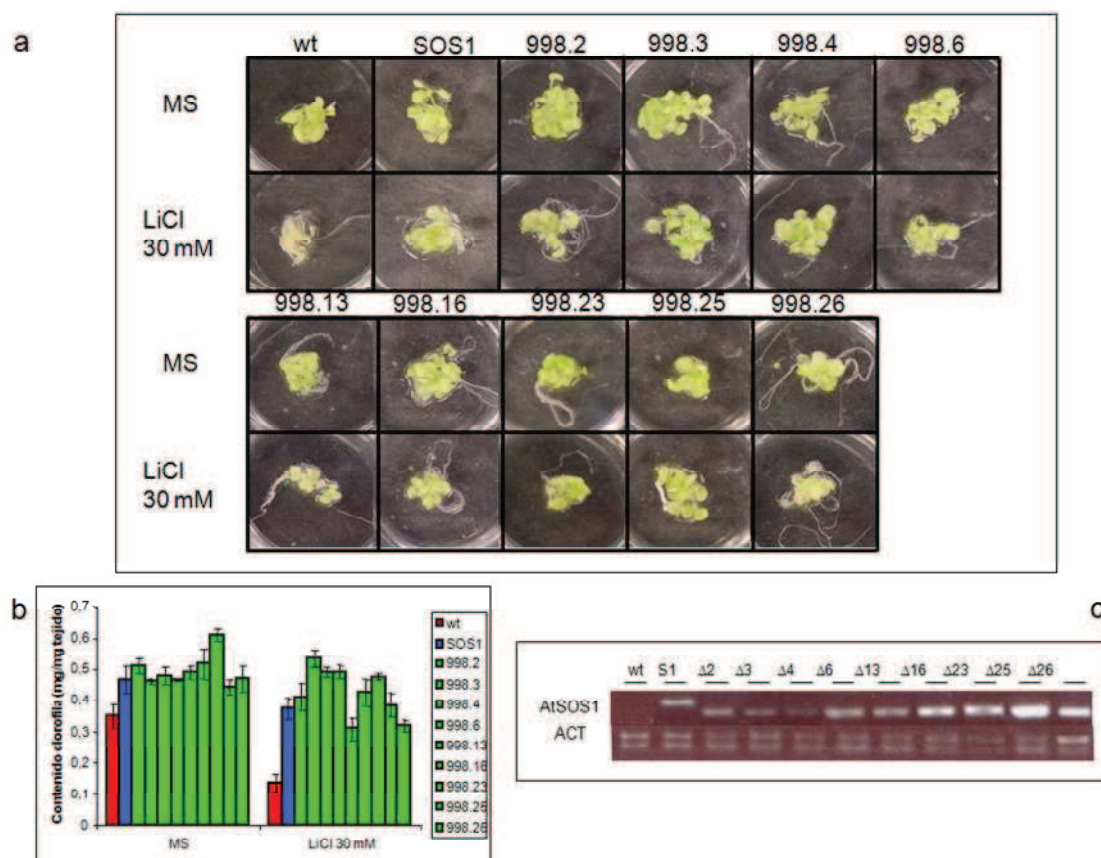


Figura R.2.17. Tratamiento con LiCl en líneas transformadas con el alelo *SOS1Δ998* en el fondo silvestre Col-0 *g11*. Plantas de 7 días germinadas en MS se transfirieron a placas con MS líquido, normal y suplementado con LiCl 30 mM. A los 10 días, se fotografiaron las plantas (a), se pesaron en grupos de 6-10 y se extrajo la clorofila añadiendo 1 ml de acetona al 80%. A las 24 horas, se determinó el contenido en clorofila (b) midiendo la absorbancia a 646 y 663 nm en un espectrofotómetro. (c) Cuantificación de la acumulación del transcrito de *AtSOS1* mediante RT-PCR semicuantitativa. Las reacciones RT-PCR se realizaron utilizando una pareja de oligonucleótidos específicos para el cDNA de *SOS1* expresado en el vector pBI321 (*SOS1Bf/NOSTr*) (panel superior) y otra para el gen de expresión constitutiva *ACTINA* (*ACTf/ACTr*) (panel inferior). El análisis de la expresión del transgén se realizó con 9 líneas independientes transformadas con el alelo mutante *SOS1Δ998*, utilizándose la línea silvestre Col-0 *g11* sin transformar o sobreexpresando *SOS1* como controles negativo y positivo respectivamente.

### R.2.3 Análisis del nivel de expresión del transgén por RT-PCR semicuantitativa.

Para cada alelo de *SOS1*, se observó gran variabilidad en el comportamiento de las distintas líneas independientes en todos los tratamientos ensayados (ver apartado R.2.2). Puesto que estas diferencias podrían deberse a que las líneas mostraran distintos niveles de expresión del transgén, se cuantificó el nivel de acumulación del mismo mediante RT-PCR semicuantitativa (Figuras R.2.14 (c) a R.2.17 (c)). Se extrajo el RNA total (ver apartado M.3.1.) de plántulas de 7 días germinadas en MS pertenecientes a la línea silvestre Col-0 *g11*, el control positivo sobreexpresando el alelo silvestre *SOS1* y las distintas líneas transformadas con cada uno de los 4 alelos mutantes. El cDNA, obtenido mediante la utilización del kit *Quanti Tect Reverse Transcription Kit* (Qiagen), se utilizó como molde en una amplificación con las parejas de oligonucleótidos específicos del transgén 998BamHI\_f/NOSTerm\_r o *SOS1A\_f/NOSTerm\_r* (ver apartado M.3.4.). Como control de carga, se amplificó el cDNA también con

oligonucleótidos específicos para *ACTINA-8* (At1g49240) (*Act8\_f/Act8\_r*), ya que este gen es de expresión constitutiva en *Arabidopsis* (An *et al.*, 1996).

Como podía predecirse a raíz de la complementación del mutante *sos1-1* por los distintos alelos de *SOS1* (apartado R.2.1), la sobreexpresión de todos ellos produjo acumulación de RNA mensajero del transgén en las distintas líneas transformadas con los 4 alelos mutantes en fondo Col-0 *gl1*. Si bien la mayoría de líneas mostraron un nivel similar de acumulación del transcrito, sí se observaron líneas con un nivel de expresión del transgén superior o inferior. Sin embargo, no existe una correlación aparente entre el nivel de expresión del transgén y la tolerancia a salinidad observada en las líneas transgénicas: entre las líneas con mayor nivel de expresión se incluyen tanto algunas que mostraron un buen nivel de tolerancia a  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Li}^+$  (como 998.25, E261K.14, o P985S.11) como otras en las que sucedió todo lo contrario (A399V.3 o E261K.11). Lo mismo sucede con las líneas que mostraron una menor acumulación del transcrito, entre las que se incluyen líneas resistentes (como A399V.11, 998.4 o P985S.9) y sensibles (P985S.7 o P985S.13) a salinidad.

#### **R.2.4. Ensayos en cultivo hidropónico.**

El cultivo *in vitro*, tanto en medio sólido como líquido, presenta muchas ventajas derivadas de la comodidad de manejo y rapidez de los ensayos. Sin embargo, las plantas muestran una gran reducción en su tasa de transpiración en este tipo de ensayos. La transpiración contribuye en gran medida al transporte de iones hacia la parte aérea, por lo que las condiciones no transpirantes no son las más adecuadas para evaluar tolerancia a cationes tóxicos (Flowers, 2004) Por este motivo se realizaron ensayos en cultivo hidropónico (ver apartado M.1.3.5.), que además de controlar con precisión la composición en macro y micronutrientes del medio, permite a las plantas crecer en condiciones mucho más fisiológicas. Se utilizó solución nutritiva estándar (sin  $\text{Na}^+$ , 1 mM  $\text{K}^+$ ) para el crecimiento de las plantas, dado que su concentración moderada de  $\text{K}^+$  permite determinar la posible implicación del antiportador *SOS1* no sólo en la respuesta a estrés salino sino también en el mantenimiento de la homeostasis de potasio. Plantas de 3 semanas crecidas en solución nutritiva estándar se transfirieron a medio nuevo normal, suplementado con 120 mM NaCl o con 20 mM LiCl y se dejaron crecer durante 6 días. Finalizado el tratamiento, se fotografiaron plantas representativas para cada línea y tratamiento (Figuras R.2.18, R.2.19, R.2.21 y R.2.22) y se tomaron muestras de parte aérea, de las que se determinó el peso fresco. Finalmente, las muestras se incubaron en estufa a 65 °C durante al menos 5 horas para desecarlas y poder determinar su peso seco.

Se realizó el experimento en dos tandas representadas en las figuras R.2.18 y 19, y R.2.21 y 22. Para la primera tanda se seleccionaron 5 líneas del alelo de clase I *SOS1\_A399V* y 5 de *SOS1\_E261K*, mientras que para la segunda se utilizaron 4 líneas del alelo de clase II *SOS1\_P985S* y 5 de *SOS1\_A998*. Nuevamente, las líneas transformadas con el alelo *SOS1\_A998* y tratadas con NaCl mostraron, en general, mejor aspecto y mayor contenido de

agua (obtenido mediante la expresión  $\%H_2O = 100 \cdot (Pf-Ps)/Pf$ ) que el control positivo transformado con el alelo silvestre. Por el contrario, los otros 3 alelos, *SOS1\_A399V*, *SOS1\_E261K* y *SOS1\_P985S* mostraron peor aspecto (Figuras R.2.18 a R.2.21) y menor contenido en agua (Figuras R.2.22 (a) y R.2.23 (a)) que el control positivo con *SOS1* silvestre al finalizar el tratamiento con NaCl. El tratamiento con LiCl también mostró resultados parecidos a los obtenidos en medio MS líquido: varias de las líneas independientes de los alelos *SOS1\_A399V*, *SOS1\_E261K* y *SOS1\_1998* presentaron una tolerancia ligeramente mayor (observada tanto fenotípicamente como mediante la medida del contenido en agua) que el control sobreexpresando el alelo silvestre, mientras la tolerancia del alelo *SOS1\_P985S* fue similar. Estos resultados confirman tanto la mayor tolerancia a  $Na^+$  conferida por el alelo *SOS1\_1998* observada *in vitro* como el mejor comportamiento frente a  $Li^+$  mostrado por la mayoría de alelos de *SOS1*, validando por lo tanto los datos obtenidos con las plantas en cultivo líquido.

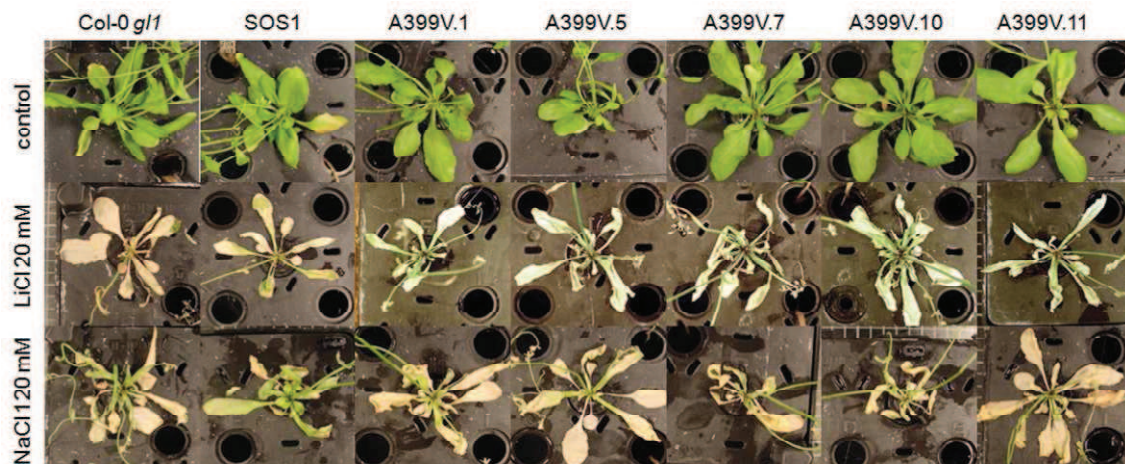


Figura R.2.18. Tratamiento con LiCl y NaCl en medio hidropónico para las líneas transformadas con el alelo *SOS1\_A399V*. Tras la germinación, plantas de las líneas indicadas se transfirieron a bandejas con solución nutritiva (sin  $Na^+$ , 1 mM  $K^+$ ). A las 3 semanas, se transfirieron a medio nuevo, normal, suplementado con 20 mM LiCl o con 120 mM NaCl, y se fotografiaron a los 6 días.

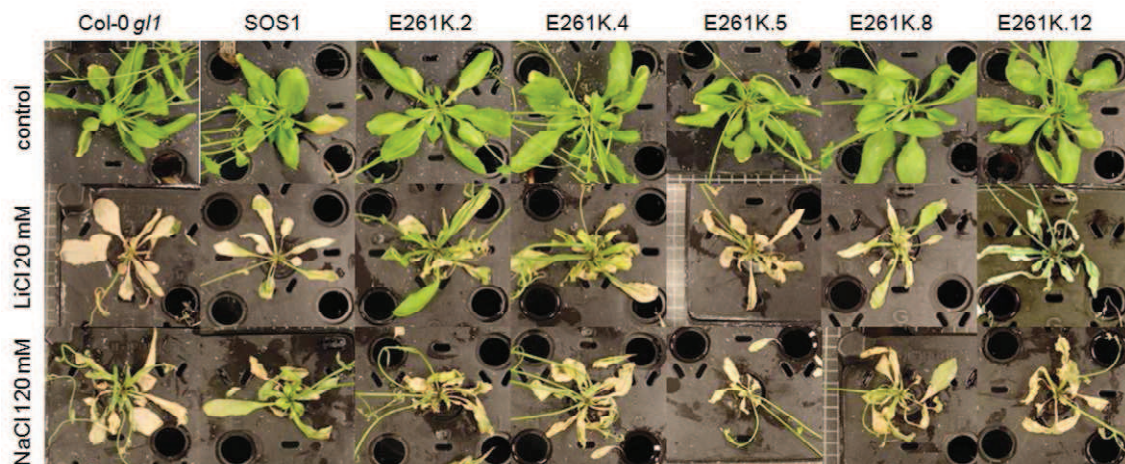




Figura R.2.19. Tratamiento con LiCl y NaCl en medio hidropónico para las líneas transformadas con el alelo *SOS1\_E261K*. Tras la germinación, plantas de las líneas indicadas se transfirieron a bandejas con solución nutritiva (sin Na<sup>+</sup>, 1 mM K<sup>+</sup>). A las 3 semanas, se transfirieron a medio nuevo, normal, suplementado con 20 mM LiCl o con 120 mM NaCl, y se fotografiaron a los 6 días.

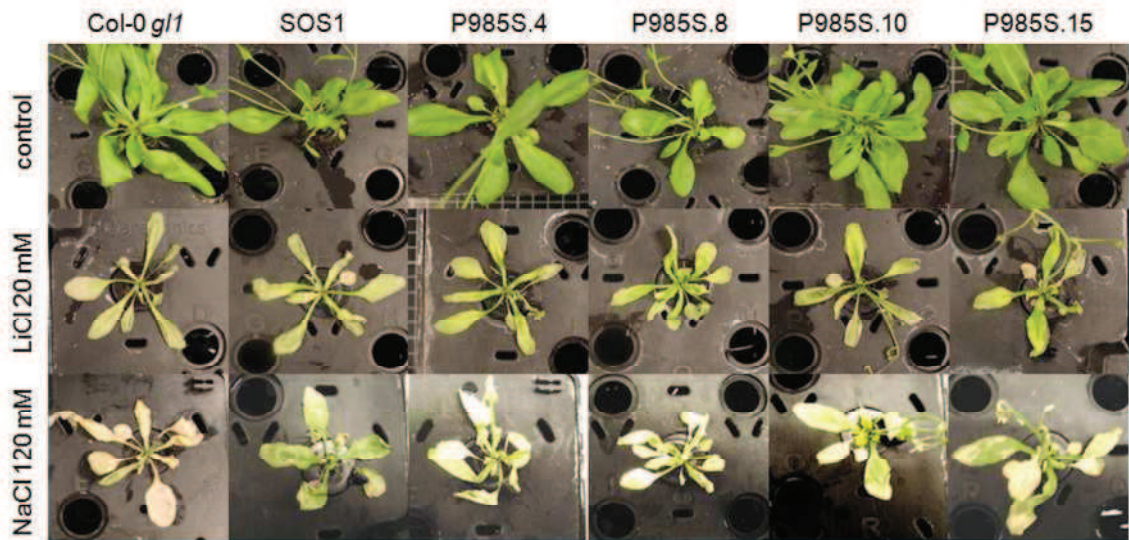


Figura R.2.20. Tratamiento con LiCl y NaCl en medio hidropónico para las líneas transformadas con el alelo *SOS1\_P985S*. Tras la germinación, plantas de las líneas indicadas se transfirieron a bandejas con solución nutritiva (sin Na<sup>+</sup>, 1 mM K<sup>+</sup>). A las 3 semanas, se transfirieron a medio nuevo, normal, suplementado con 20 mM LiCl o con 120 mM NaCl, y se fotografiaron a los 6 días.

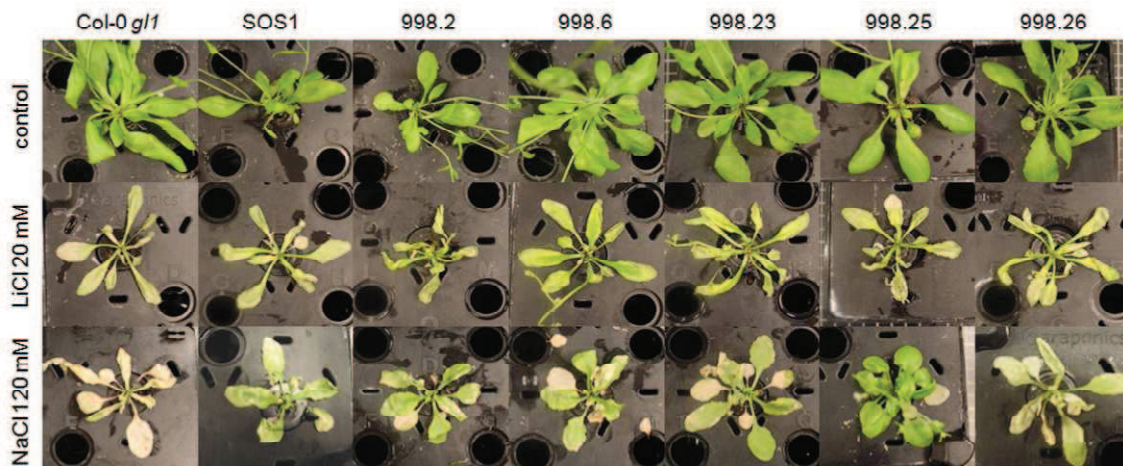


Figura R.2.21. Tratamiento con LiCl y NaCl en medio hidropónico para las líneas transformadas con el alelo *SOS1\_Δ998*. Tras la germinación, plantas de las líneas indicadas se transfirieron a bandejas con solución nutritiva (sin Na<sup>+</sup>, 1 mM K<sup>+</sup>). A las 3 semanas, se transfirieron a medio nuevo, normal, suplementado con 20 mM LiCl o con 120 mM NaCl, y se fotografiaron a los 6 días.

### R.2.6 Determinación de los contenidos iónicos.

Para comprobar si los fenotipos observados se debían a diferencias en la acumulación de los cationes K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, se procedió a la determinación de los contenidos iónicos en parte aérea. Los iones de las muestras desecadas se extrajeron añadiendo la cantidad fija de 1 ml de agua milli-Q e incubando durante 1 hora a 95°C. El extracto se diluyó a una concentración

adecuada en agua milli-Q y se determinaron los contenidos de  $K^+$ ,  $Li^+$  y  $Na^+$  utilizando un espectrómetro de absorción atómica (ver apartado M.7.5.).

Los contenidos de  $K^+$  mostraron gran variabilidad dentro de una misma línea, indicando poca uniformidad en el ensayo realizado con alelos de clase I (Figura R.2.22. (b)). En general todas las líneas mostraron unos contenidos sin diferencias significativas ni entre sí ni entre tratamientos, descartando tanto el papel de *SOS1* en la toma de este catión como la implicación del efecto deletéreo de los cationes tóxicos sobre la toma de  $K^+$  en las ligeras diferencias fenotípicas observadas. La sobreexpresión del alelo silvestre *SOS1* redujo ligeramente la acumulación de  $Li^+$  en la parte aérea (Figura R.2.22. (c)), efecto que fue un poco mayor en las líneas transformadas con *SOS1\_E261K*. Aunque en las líneas transformadas con *SOS1\_A399V* se vio una mayor acumulación de  $Li^+$ , el mayor cociente  $K^+ : Li^+$  (Figura R.2.24 (c)) podría explicar la ligera halotolerancia observada. La sobreexpresión de *SOS1* redujo la acumulación de  $Na^+$  con respecto a la línea silvestre en el tratamiento con 120 mM NaCl (Figura R.2.22. (d)). En consonancia con la falta de halotolerancia conferida por los alelos *SOS1\_E261K* y *SOS1\_A399V*, la acumulación en las líneas transformadas con ellos fue mayor que en el control positivo, efecto que se vio más claramente al representar el cociente  $K^+ : Na^+$  (Figura R.2.24 (d)).

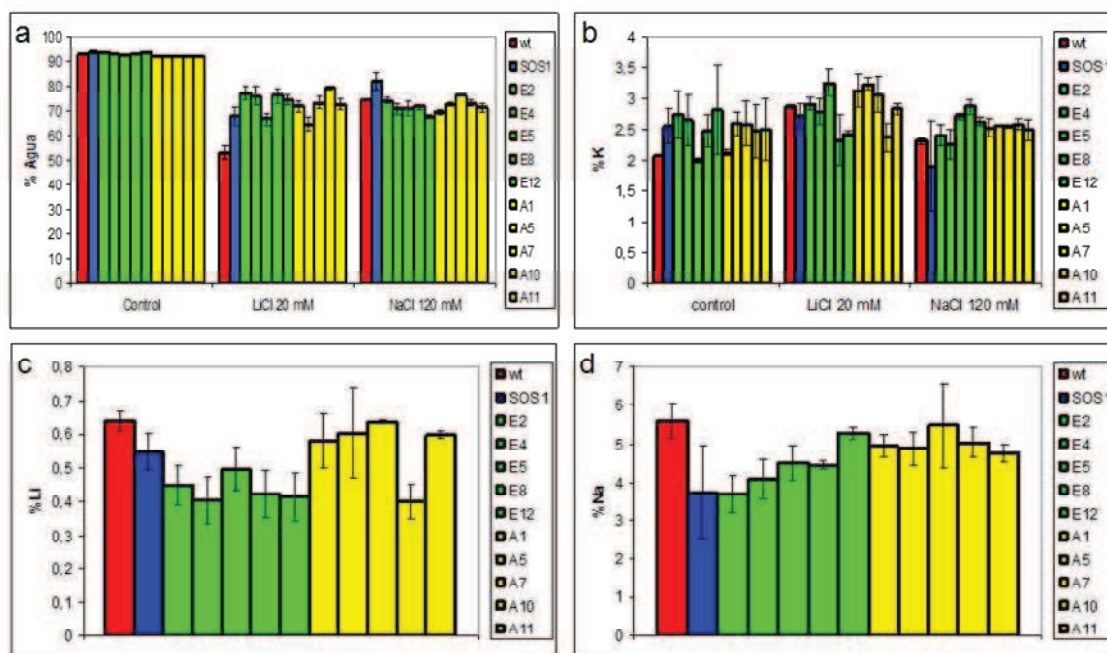


Figura R.2.22. Tratamiento con LiCl y NaCl en medio hidropónico para las líneas sobreexpresantes transformadas con los alelos *SOS1\_A399V* y *SOS1\_E261K*. Al finalizar el tratamiento (figuras R.2.18. y R.2.19.), se tomaron muestras de la parte aérea de las plantas y se determinó su peso fresco. Las muestras se incubaron durante 5 h en estufa a 65 °C y se determinó su peso seco. El porcentaje de agua al final del tratamiento (a) se obtuvo dividiendo entre el peso fresco la diferencia entre los pesos fresco y seco. Para la extracción de iones, se añadió 1 ml de agua de calidad milli-Q a las muestras y se incubaron a 95°C durante 1 h. Con diluciones del extracto se midieron en un espectrómetro de absorción atómica los contenidos de  $K^+$  (b),  $Li^+$  (c) y  $Na^+$  (d) y se calculó el porcentaje que cada uno representaba en el peso seco de la muestra.

En el experimento realizado con alelos de clase II, volvió a verse una gran variabilidad dentro de cada línea en la acumulación de  $K^+$  (Figura R.2.23 (b)). Mientras los contenidos fueron similares para todas las líneas entre sí y entre el tratamiento control y con 20 mM LiCl, el tratamiento con 120 mM NaCl sí mostró una clara reducción en la acumulación de  $K^+$  en todas las líneas. Puesto que la duración y concentración salina del tratamiento fueron las mismas que en el caso de los alelos de clase I, estas diferencias parecen ser de tipo experimental (ej: la distinta posición de la bandeja en la cámara de cultivo indujo una mayor transpiración de las plantas). Los contenidos de  $Li^+$  mostraron menos diferencias entre líneas que en el experimento anterior (Figura R.2.23 (c)), incluso al representar el cociente  $K^+ : Li^+$  (Figura R.2.24 (c)). Las

medidas para la acumulación de  $\text{Na}^+$  (Figura R.2.23. (d)) no mostraron diferencias acordes con los fenotipos observados, indicando un posible error en las condiciones del experimento.

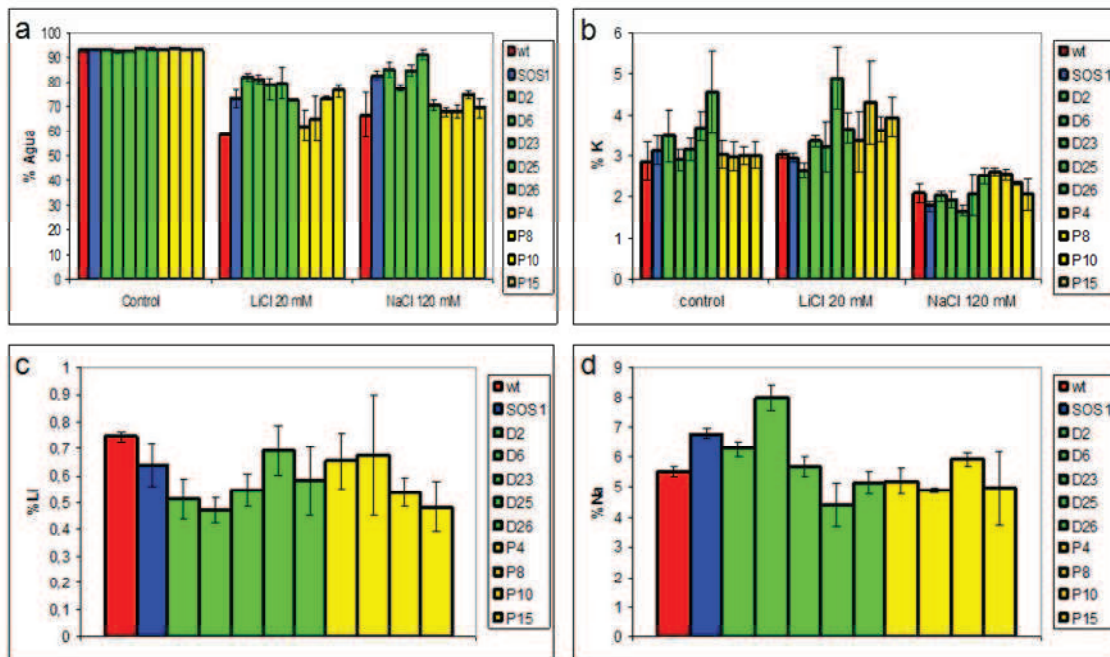


Figura R.2.23. Tratamiento con LiCl y NaCl en medio hidropónico para las líneas sobreexpresantes transformadas con los alelos *SOS1 $\Delta$ 998* y *SOS1\_P985S*. Al finalizar el tratamiento (figuras R.2.21. y R.2.22.), se tomaron muestras de la parte aérea de las plantas y se determinó su peso fresco. Las muestras se incubaron durante 5 h en estufa a 65 °C y se determinó su peso seco. El porcentaje de agua al final del tratamiento (a) se obtuvo dividiendo entre el peso fresco la diferencia entre los pesos fresco y seco. Para la extracción de iones, se añadió 1 ml de agua de calidad milli-Q a las muestras y se incubaron a 95°C durante 1 h. Con diluciones del extracto se midieron en un espectrómetro de absorción atómica los contenidos de  $\text{K}^+$  (b),  $\text{Li}^+$  (c) y  $\text{Na}^+$  (d).

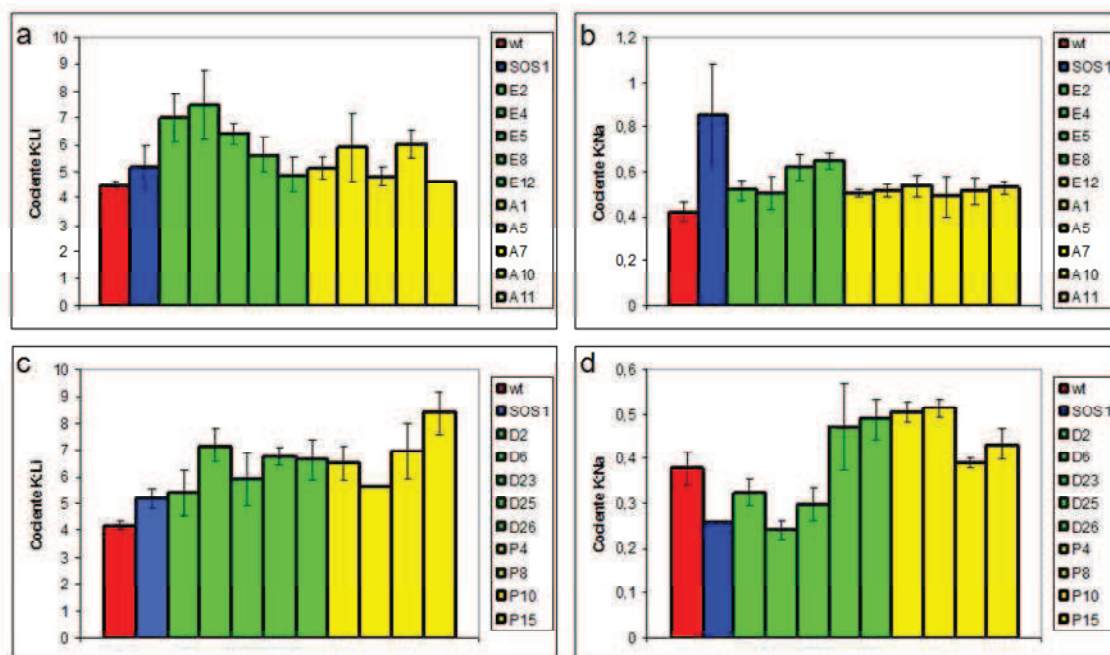


Figura R.2.24. Cocientes  $\text{K}^+:\text{Li}^+$  y  $\text{K}^+:\text{Na}^+$ . Se calcularon los cocientes  $\text{K}^+:\text{Li}^+$  (a y c) y  $\text{K}^+:\text{Na}^+$  (b y d) al finalizar los tratamientos con las plantas transformadas con los alelos *SOS1\_E261K* y *SOS1\_A399V* (a y b) y *SOS1\_P985S* y *SOS1 $\Delta$ 998* (c y d).

### R.2.7 Rastreo de alelos hiperactivos de *SOS1* en *Arabidopsis*.

Puesto que los alelos hiperactivos aislados en levadura no mantuvieron, en general, su fenotipo de mayor tolerancia a  $\text{Na}^+$  *in planta*, se decidió realizar un nuevo rastreo de alelos hipermorfos directamente en *Arabidopsis* para evitar el problema de la no reproducibilidad de los fenotipos hallados en levadura. La transformación con genotecas de cDNA puede producir fenotipos dominantes de pérdida de función por cosupresión de genes mediante sobreexpresión de cDNAs truncados o antisentido (LeClere y Bartel, 2001). Esta posible desventaja se superó con el diseño del sistema FOX (*Full-length cDNA Overexpresser*), de expresión de cDNAs completos bajo el control del promotor CaMV35S (Ichikawa *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2007). Sin embargo, la activación constitutiva de genes puede interferir en la proliferación y desarrollo celular, produciendo plantas enanas y/o estériles (Kasuga *et al.*, 1999; Gilmour *et al.*, 2000). El sistema COS (*Controlled cDNA Overexpression System*) se creó para evitar los problemas derivados de la activación constitutiva de genes. El plásmido pER8 contiene el activador transcripcional inducible por estradiol XVE, construido mediante la fusión del dominio de unión a DNA del represor bacteriano LexA, el dominio ácido transactivador de VP16 y la región reguladora del receptor humano de estrógenos. En plantas de tabaco y *Arabidopsis* transformadas con el gen marcador GFP controlado por el promotor 35S y clonado en este vector, la expresión del transgén se vio estrictamente controlada por la adición de estradiol al medio, no observándose niveles del transcrito detectables en ausencia de esta hormona (Zuo *et al.*, 2000). El vector pER8-GW, versión Gateway del anterior, se utilizó para identificar varios cDNAs que conferirían fenotipos dominantes de resistencia a estrés en tres rastreos distintos: tolerancia a sal, insensibilidad a ABA y activación del gen ADH1-LUC inducida por estrés (Papdi *et al.*, 2008).

En nuestro rastreo, se utilizó el sistema COS en la búsqueda de alelos hiperactivos de *SOS1 in planta* (Figura R.2.25), empleándose la tecnología Gateway<sup>®</sup> para la construcción de la genoteca. El cDNA completo de *SOS1* se amplificó por PCR con los oligonucleótidos attB1-SOS1\_f y attB2-SOS1\_r, que le unen los sitios attB en ambos extremos (ver apartados M.2.6.6. y M.2.5.). El producto de PCR se purificó mediante centrifugación con TE y una solución 30% PEG y 30 mM  $\text{MgCl}_2$  para eliminar los oligonucleótidos y se transfirió, mediante recombinación mediada por BP clonasa<sup>™</sup> (Invitrogen), al plásmido con sitios attP, pDONR<sup>™</sup>201. El cDNA clonado en este vector se propagó en la cepa mutagénica de *E. coli* XL1-Red (ver apartado M.2.7.), recuperándose una población de cDNA mutagenizado aleatoriamente de aproximadamente 100,000 colonias independientes. Para estimar la tasa de mutagénesis debida a la propagación del plásmido en la cepa de *E. coli* XL1-Red, se transformaron células competentes de *E. coli* XL10 Gold con la genoteca mutagenizada y se seleccionaron 48 colonias independientes de transformantes. Una vez extraído el plásmido, se secuenció el extremo 5' del cDNA utilizando el oligonucleótido pDONR\_f y se contaron las mutaciones (8 en

un total de ~24000 pb secuenciadas), estimándose una tasa mutagénesis de 1 mutación por cada 3000 pb. Puesto que el cDNA de SOS1 tiene una longitud de 3.4 kb, se espera aproximadamente 1 mutación en el cDNA de cada plásmido independiente. La genoteca se transfirió, por recombinación entre sitios attL y attR con LR clonasa™ (Invitrogen), al vector de sobreexpresión controlada de cDNA pER8-GW, portador de sitios attR. Mediante el uso de la cepa de *Agrobacterium* GV3101, se realizó una transformación a gran escala de plantas silvestres de *Arabidopsis* Col-0 *g1* con la colección de alelos mutantes clonada en este vector (ver apartados M.4.2.4. y M.4.4.). La descendencia T1 proveniente de la transformación se recolectó y se seleccionaron individuos por su tolerancia a NaCl (Figura R.2.25). Unas 900,000 semillas T1 se sembraron en medio MS suplementado con 25 µg/ml de higromicina B y se incubaron a temperatura ambiente y con baja iluminación. Las plántulas transgénicas (unas 20,000), seleccionadas a los 7 días por presentar el hipocotilo elongado, se transfirieron a MS suplementado con 200 mM de NaCl y 4 µM de estradiol. A los 4 días, las plántulas con cotiledones verdes (unas 150) se transfirieron a MS normal, donde se dejaron crecer durante 2 días, y finalmente a tierra para obtener su descendencia por autofecundación (ver apartados M.1.3.2. y M.1.3.3.).

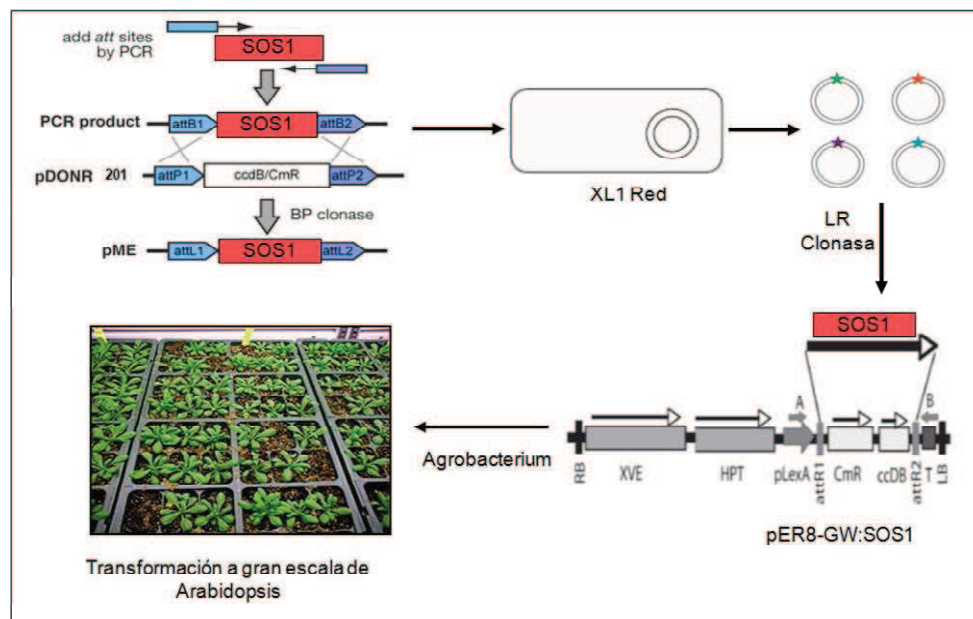


Figura R.2.25. Transformación de *Arabidopsis* con genoteca de *SOS1* mutado aleatoriamente. El producto de PCR attB-SOS1, después de ser clonado por recombinación BP en el vector pDONR201, se propagó en la cepa mutagénica de *E. coli* XL1-Red. Se obtuvo así una genoteca de alelos con mutaciones al azar, que se clonó por recombinación LR en el vector de sobreexpresión controlada de cDNA pER8-GW. Esta genoteca, una vez introducida en *A. tumefaciens*, se utilizó para realizar una transformación a gran escala de plantas silvestres de *Arabidopsis* Col-0 *g1*.

Una vez obtenida la descendencia T2, se procedió a la confirmación de fenotipos mediante la repetición del procedimiento seguido para la T1, si bien debido a la menor densidad de plántulas por placa se redujo la concentración de NaCl de 200 a 150 mM. Para descartar transformantes en los que la mayor halotolerancia se debiera al propio proceso de transformación, que es mutagénico, y no a la sobreexpresión de un alelo hiperactivo de *SOS1*,

las plántulas se transfirieron también a MS con NaCl pero sin estradiol, eliminándose las líneas para las que el fenotipo se mantenía en este medio. Se cuantificó la tolerancia a sal, expresándose tanto en porcentaje de plantas con algún cotiledón verde como en porcentaje de cotiledones verdes dentro del total, y se seleccionaron 7 líneas en las que estos parámetros fueron mayores del 50% (Figura R.2.26 (a) y (b)).

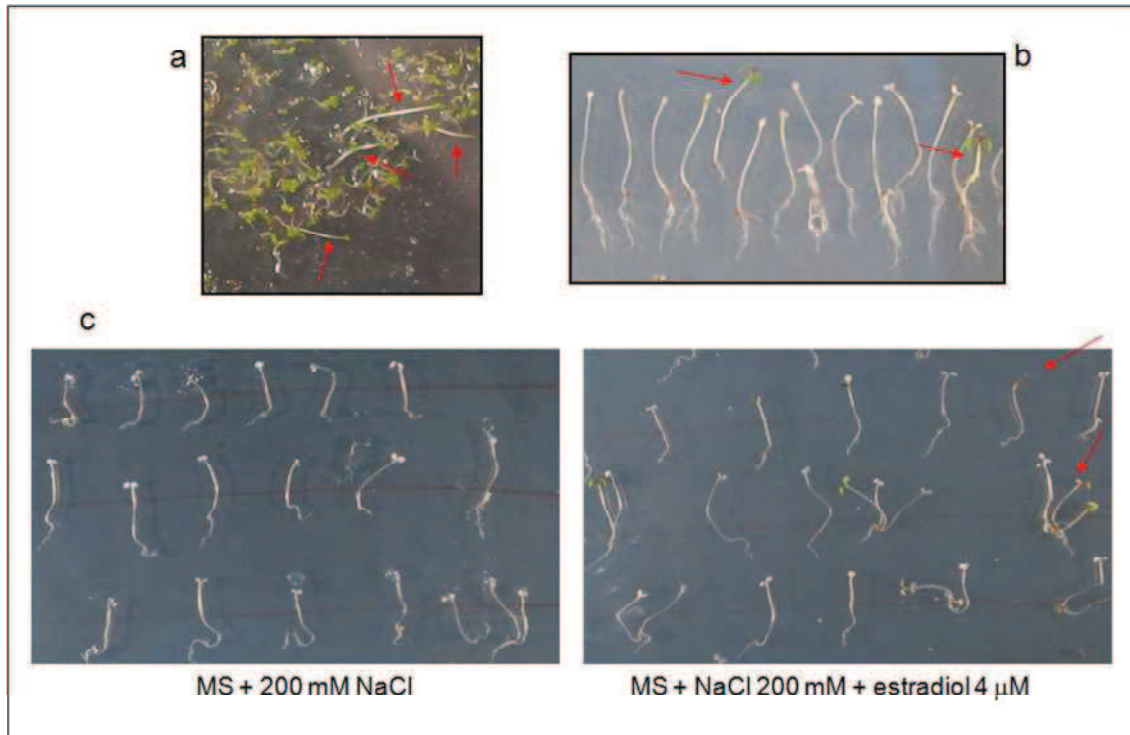


Figura R.2.26. Rastreo de semillas para identificar alelos hiperactivos de *SOS1*. Las semillas provenientes de la transformación se sembraron en medio con 25 μg/ml de higomicina y se incubaron con poca iluminación durante 6 días, seleccionándose las plántulas transgénicas por presentar hipocotilo elongado (a). Éstas se transfirieron a medio MS suplementado con NaCl 200 mM y estradiol 4 μM para inducir la expresión del cDNA. A los 4 días, se seleccionaron las plántulas con cotiledones verdes (b) y se transfirieron a tierra para propagar las líneas transgénicas. Tras obtener la F2 (c), se repitió el procedimiento visto en (a) y (b) para confirmar fenotipos de halotolerancia. Se incluyó también un control sin estradiol para descartar líneas en las que la halotolerancia podría estar debida a la inserción del transgén y no a la expresión del cDNA de *SOS1*.

### R.2.8 Secuenciación del transgén en los candidatos seleccionados.

Se extrajo DNA genómico de las 7 líneas seleccionadas (ver apartado M.2.1.2) y se amplificó el cDNA completo del transgén por PCR con la pareja de oligonucleótidos específicos del vector pER8-GW ER8A\_f/ER8B\_r y la polimerasa *iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase*. La banda de 3.4 kb se cortó de un gel de agarosa y se purificó (ver apartados M.2.4 y M.2.5), secuenciándose el producto completo con los oligonucleótidos ER8A\_f, NHE4P1\_f, SOSDN\_f, SOS1+1326\_f, SOS1Xho\_f, SOS1A\_f, SOS1B\_f y 998BamHI\_f. Los resultados se analizaron con el programa *Seqman* incluido en el paquete informático DNA Star.

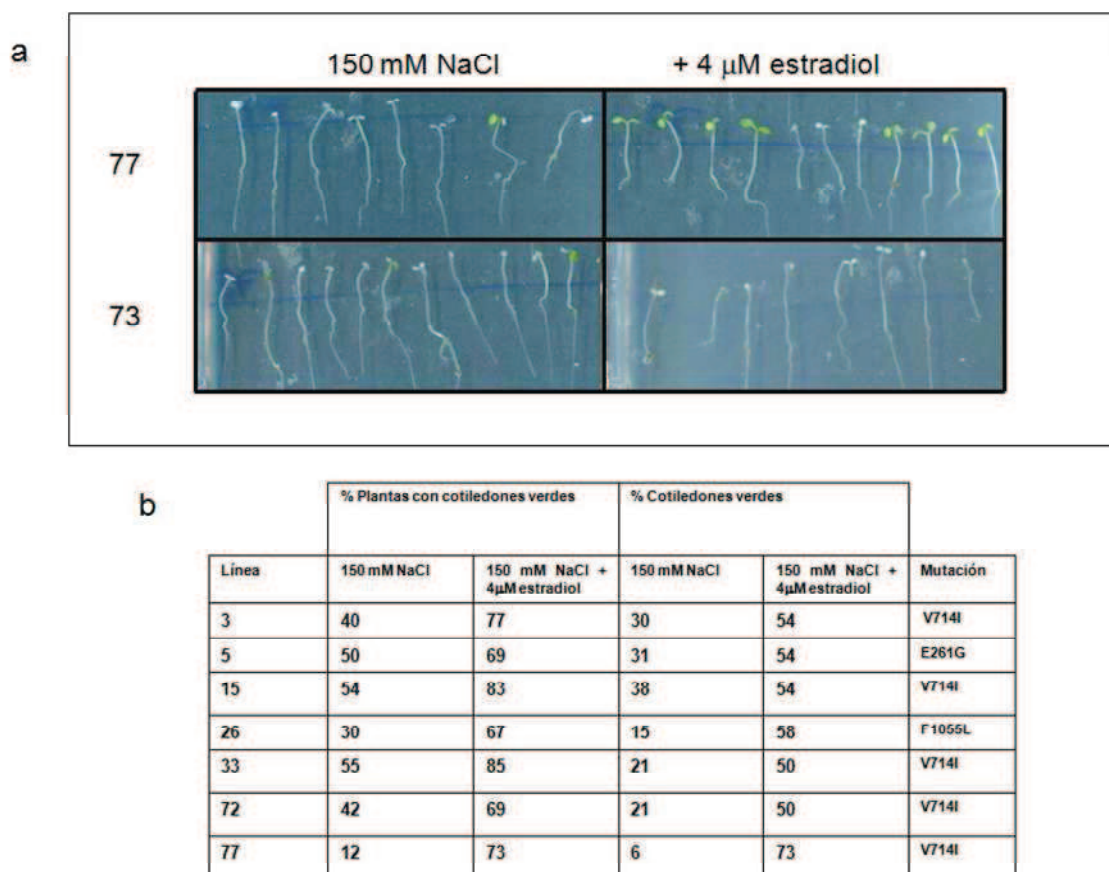


Figura R.2.27. Confirmación de la halotolerancia de las líneas seleccionadas. Las líneas F2 procedentes de plantas F1 seleccionadas se evaluaron por para confirmar su halotolerancia. Para ello, se sembraron las semillas en medio con 25  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina y se incubaron con poca iluminación durante 6 días, seleccionándose las plántulas transgénicas por presentar hipocotilo elongado. Éstas se transfirieron a medio MS suplementado con NaCl 150 mM y estradiol 4  $\mu\text{M}$  para inducir la expresión del cDNA. A los 4 días, se fotografiaron las plantas y se evaluó la halotolerancia de las distintas líneas contando el número de cotiledones verdes y se descartaron aquéllas en las que este porcentaje fuera inferior al 50%. Se incluyó también un control sin estradiol para descartar líneas en las que la halotolerancia podría estar debida a la inserción del transgén y no a la expresión del cDNA de *SOS1*. El cDNA del transgén se amplificó con la pareja de oligonucleótidos específicos del vector pER8-GW ER8A/ER8B y la polimerasa de alta fidelidad *iProof*, se purificó la banda de un gel de agarosa y se secuenció el cDNA completo. (a) Comparación de la línea tolerante 77 con una que no lo es (73) en medio con 150 mM NaCl, con y sin estradiol. (b) Tabla en la que se muestran las distintas líneas seleccionadas, sus porcentajes de supervivencia (expresados como porcentaje de plantas con algún cotiledón verde y como porcentaje de cotiledones verdes al finalizar el tratamiento) y las mutaciones identificadas en los cDNAs.

Una representación de la proteína *SOS1* con la localización de todas las mutaciones puede verse en la figura R.2.28. En 5 de las 7 líneas (3, 15, 33, 72 y 77) se observó una mutación de la guanina en la posición 2020 a adenina, produciendo una transición del aminoácido valina a isoleucina en la posición 714, cerca del dominio putativo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD, del inglés *Cyclic Nucleotide Binding Domain*), lo que posiblemente esté impidiendo la interacción de éste con el dominio carboxiterminal autoinhibitorio y manteniendo a la proteína constitutivamente activa. Interesantemente, la mutación de una valina a isoleucina, esta vez en el inicio del dominio CNBD, también se aisló en nuestro laboratorio en el rastreo de alelos hiperactivos de *SOS1* en levadura, así como repetidas veces entre los segmentos transmembrana 8 y 12 en un rastreo de mutantes de *NHX1* tolerantes a NaCl y LiCl (Hernández *et al.*, 2009). En la línea número 5, la mutación de adenina a guanina produjo un cambio del ácido glutámico en la posición 261, presumiblemente situado en el

segmento transmembrana número 7, a glicina. Cabe destacar que aunque el fenotipo no se repitió en planta, una mutación en este aminoácido ya había sido identificada en el rastreo realizado en levadura en nuestro laboratorio (Quintero *et al.*, 2011), demostrando su importancia para la función de la proteína. Finalmente, la línea número 26 contiene un cambio de timina por citosina en la posición 3163, mutando la fenilalanina de la posición 1055 a leucina. Si bien en el rastreo realizado en levadura no se encontró ninguna mutación tan aguas abajo, la mayoría de alelos de clase II aislados consistían en mutaciones en el dominio autoinhibitorio. Puesto que este aminoácido se encuentra también situado en este dominio, la mutación estaría impidiendo la interacción de este dominio con el CNBD, codificándose también una proteína constitutivamente activa.

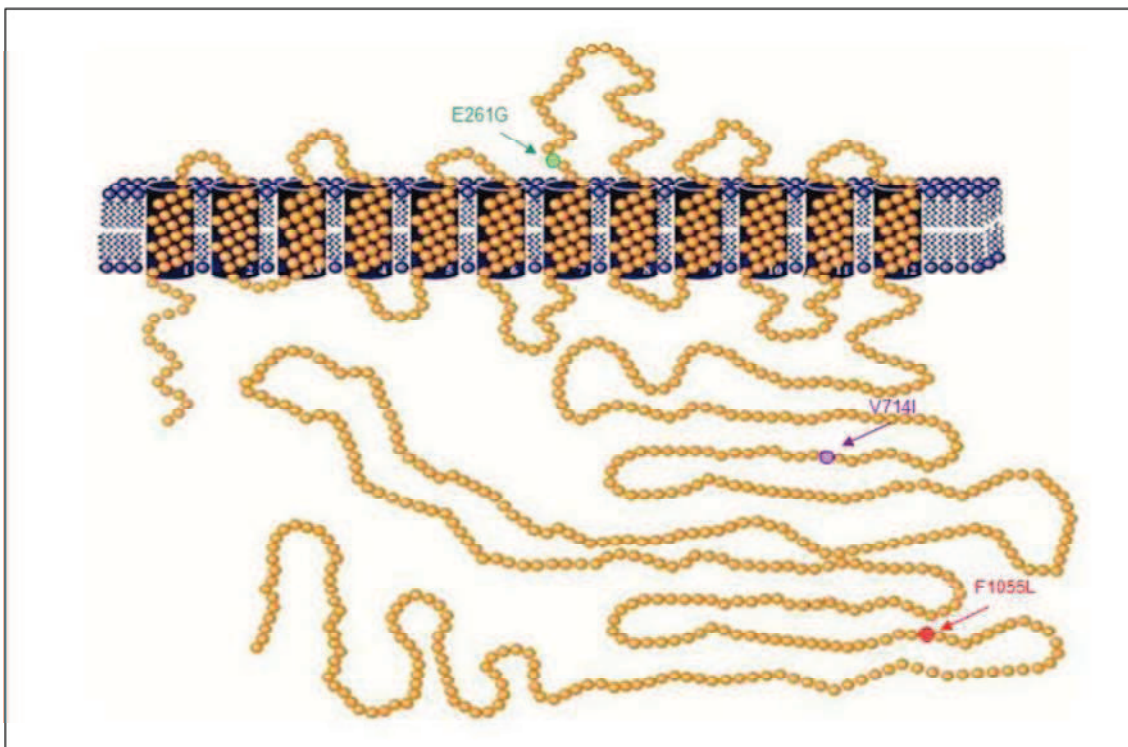


Figura R.2.28. Representación de las mutaciones aisladas dentro de la proteína. Se muestra la estructura de SOS1, indicándose las tres mutaciones aisladas en el rastreo.



## V. DISCUSIÓN.

### D.1. Intervención del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ SOS1 en la homeostasis de $\text{K}^+$ .

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de la ruta SOS, los esfuerzos se han centrado en investigar la estructura, función y regulación de SOS1 por SOS2 y SOS3 en relación con el transporte de  $\text{Na}^+$  y su contribución a la tolerancia salina, mientras que el fenotipo de los mutantes *sos* de déficit de crecimiento en medios pobres en  $\text{K}^+$  encontrado en el primer rastreo no ha sido, generalmente, estudiado en detalle. Sólo un estudio de Qi y Spalding (2004) relacionaba la presencia de una proteína SOS1 funcional con la toma de  $\text{K}^+$  a través de AKT1, ya que al inhibirse este canal en presencia de concentraciones moderadas de  $\text{Na}^+$  en la raíz, se impedía la adquisición de  $\text{K}^+$  de una forma mucho más severa en la línea mutante *sos1* que en plantas silvestres sometidas a tratamiento salino. Posteriormente, la supresión por parte de AtSOS1 del fenotipo de un mutante de *E. coli* deficiente en la toma de  $\text{K}^+$  (Garcia deblás *et al.*, 2007) demostraba el transporte directo de este catión por SOS1 en bacteria, aunque se sugería que este efecto podría deberse a su expresión heteróloga.

A la vista de estos antecedentes, y puesto que tanto las sales MS como el bacto-agar contienen trazas de  $\text{Na}^+$ , se postuló en nuestro laboratorio, en concordancia con la hipótesis de Qi y Spalding, que el  $\text{Na}^+$  presente como contaminante en los medios de cultivo podría ser suficiente para acumularse en la raíz del mutante *sos1*, produciendo la inhibición de AKT1 y el subsiguiente fenotipo de bajo crecimiento en medios pobres en  $\text{K}^+$ . Con la formulación de una solución nutritiva basada en la de Hewitt y Notton (1966)(apartado R.1.1) con ausencia total de  $\text{Na}^+$  y una concentración de  $\text{K}^+$  de 1 mM, se confirmó la implicación del  $\text{Na}^+$  en el fenotipo del mutante *sos1* a baja concentración de  $\text{K}^+$ . La línea mutante *sos1-1* crecía igual que la silvestre Col-0 *gl1* en ausencia de  $\text{Na}^+$ , mientras que la adición de este catión producía un severo fenotipo de reducción de crecimiento que sólo pudo ser atenuado parcialmente aumentando la concentración de  $\text{K}^+$  en el medio a 10 mM (Figura R.1.1).

El resultado anterior descartaba que SOS1 interviniera de forma directa en la toma de  $\text{K}^+$ , y era compatible con la teoría propuesta por Qi y Spalding, pero no demostraba que AKT1 fuera el transportador implicado. En una aproximación más completa y directa (apartado R.1.3), además de aumentar el rango de concentraciones de  $\text{K}^+$  en los medios de cultivo, se decidió incluir la línea mutante para AKT1, así como el doble mutante *akt1 x sos1*, que se obtuvo por cruzamiento clásico entre las líneas *sos1-1* y *akt1-2* (Figura R.1.2). Los fenotipos de la línea mutante *sos1-1* y la silvestre Col-0 *gl1* se mantuvieron en presencia de  $\text{Na}^+$  5 mM (Figura R.1.3). La línea mutante *akt1-2* mostró una ligera disminución de su crecimiento en los medios suplementados con 100  $\mu\text{M}$  y 1 mM de  $\text{K}^+$ , precisamente el rango de actuación de AKT1 (Lagarde *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1998), mientras que el doble mutante *akt1 x sos1* creció peor que el mutante *sos1-1* y mucho peor que el *akt1-2* en todas las condiciones, indicando un efecto aditivo de ambas mutaciones. Este resultado, junto con la debilidad del fenotipo de la mutación *akt1-2* en condiciones de déficit de  $\text{K}^+$  respecto al de *sos1-1* en presencia de  $\text{Na}^+$ , demostraba que la hipotética inhibición de AKT1 por el exceso de  $\text{Na}^+$  no era la principal causa

del fenotipo observado en estas condiciones. Finalmente, en medios con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$ , las líneas poseedoras de una proteína SOS1 funcional crecieron ligeramente mejor en presencia de  $\text{Na}^+$  5 mM, de acuerdo con el papel beneficioso del  $\text{Na}^+$  a concentraciones subtóxicas que permite su uso como osmolito en las vacuolas (Zhu et al., 1997) y activa la toma de  $\text{K}^+$  de alta afinidad (Spalding et al., 1999). En ausencia de  $\text{Na}^+$  (Figura R.1.4), el efecto de la mutación *sos1-1* desapareció y sólo se observó menor crecimiento de las plantas portadoras de la mutación *akt1-2* en el rango de actuación de AKT1, mostrando un crecimiento similar los mutantes simple y doble.

Puesto que los ensayos de crecimiento refutaban la hipótesis de Qi y Spalding (2004), se realizaron medidas de contenidos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , tanto en raíz como en parte aérea con el fin de estudiar en profundidad cómo afectaban las mutaciones *sos1-1* y *akt1-2* a la homeostasis y transporte a larga distancia de iones. Para ello, se llevaron a cabo dos experimentos: en el primero, plántulas de 7 días se transfirieron a medio suplementado con 1 o 10 mM de  $\text{K}^+$ , en presencia o ausencia de  $\text{Na}^+$  5 mM, y se dejaron crecer durante 5 semanas (Figuras R.1.6 y R.1.7). En el segundo, planeado para maximizar la cantidad de material vegetal obtenida al finalizar el tratamiento, plantas crecidas durante 3 semanas en solución nutritiva estándar suplementada con 1 mM de  $\text{K}^+$  se sometieron a un choque salino con  $\text{Na}^+$  10 mM durante 2 semanas (Figuras R.1.8 y R.1.9).

El contenido en  $\text{Na}^+$  fue muy bajo en todas las líneas en ausencia de este catión (Figuras R.1.6 y R.1.8), debiéndose probablemente su acumulación ligeramente mayor en plantas con la mutación *sos1-1* a la existencia de pequeñas trazas presentes como contaminantes en las distintas sales empleadas para la preparación de la solución stock. En presencia de  $\text{Na}^+$  5 mM (Figura R.1.6), sólo las líneas portadoras del alelo mutante *sos1-1* mostraron una acumulación masiva, tanto en raíz como en parte aérea, de este catión. El incremento de la concentración de  $\text{K}^+$  disminuye la toma de  $\text{Na}^+$  (Niu et al., 1995), por lo que no es de extrañar que las plantas sometidas a 10 mM de  $\text{K}^+$  mostraran contenidos de  $\text{Na}^+$  mucho más bajos, incluso en ausencia de una proteína SOS funcional. Los resultados fueron similares en el tratamiento alternativo con 10 mM de  $\text{Na}^+$  (Figura R.1.8), mostrando todas las líneas un obvio incremento en la toma de este catión. El mayor contenido en  $\text{Na}^+$  del mutante *sos1-1* en parte aérea parece contradecir resultados previos en cultivo hidropónico a salinidad moderada, si bien en dichos estudios los tratamientos se realizaron en plantas ya adultas, en tiempos más cortos y a mayores concentraciones de  $\text{K}^+$  (Ding y Zhu, 1997; Shi et al., 2002). Aunque en principio se postuló que SOS1 invertiría su transporte para descargar  $\text{Na}^+$  del xilema en condiciones de estrés severo (Shi et al., 2002), hoy se cree que la descarga de  $\text{Na}^+$  del xilema se realiza siempre a través de HKT1;1, coordinándose ambos antiportadores para controlar el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia (Rus et al., 2004; Sunarpi et al., 2005; Olías et al., 2009). La falta de un antiportador SOS1 funcional impide tanto la carga de  $\text{Na}^+$  al xilema como su expulsión a través de los ápices radicales en el mutante *sos1-1*, sobreacumulándose este catión en la raíz. Posteriormente se descubrió una mayor muerte celular y fragmentación vacuolar en las células del córtex del mutante *sos1-1* ante estrés salino, lo que origina un gran

aumento del contenido de  $\text{Na}^+$  en el xilema (Oh *et al.*, 2010) y podría explicar el mayor contenido de  $\text{Na}^+$  observado siempre en la parte aérea de plantas mutantes para *SOS1* sometidas a estrés salino (Shi *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2009; Olías *et al.*, 2009).

En ausencia de  $\text{Na}^+$  (Figuras R.1.7 y R.1.9) la presencia de la mutación *sos1-1* no mostró ningún efecto sobre el contenido de  $\text{K}^+$ , siendo la acumulación de este catión en los mutantes *sos1-1* y *akt1 x sos1* equiparable a la de las líneas Col-0 *gl1* y *akt1-2* respectivamente. La presencia de la mutación *akt1* redujo la toma de  $\text{K}^+$ , observándose menor contenido de este catión en las líneas *akt1-2* y *akt1 x sos1*. En presencia de  $\text{Na}^+$  5 y 10 mM (Figuras R.1.6 y R.1.8), los contenidos de  $\text{K}^+$  difirieron de los esperados, ya que el mutante simple *sos1-1* presentó un contenido de  $\text{K}^+$  mayor que la línea silvestre en parte aérea y menor en raíz, lo que sugeriría una alteración en el transporte a larga distancia de este macronutriente. Además, a pesar de las grandes diferencias fenotípicas observadas, el contenido de este catión fue igual en el mutante simple *akt1-2* y en el doble mutante *akt1 x sos1*. Los resultados de ambos ensayos descartan la existencia de un déficit en la toma de  $\text{K}^+$  en las plantas portadoras de la mutación *sos1-1*, por lo que confirman la implicación exclusiva del  $\text{Na}^+$  en los fenotipos observados, siendo el efecto aditivo del mutante doble *akt1 x sos1* debido a la suma del severo fenotipo producido por el exceso de  $\text{Na}^+$  y la menor toma de  $\text{K}^+$ , que produciría una reducción del cociente  $\text{K}^+:\text{Na}^+$  respecto al del mutante *sos1-1*. Puesto que la representación de los cocientes  $\text{K}^+:\text{Na}^+$  para todas las líneas y tratamientos no mostró una correlación clara con los fenotipos observados (datos no mostrados), la incapacidad de los mutantes *sos* para crecer en medios con déficit de  $\text{K}^+$  descrita originalmente (Wu *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998) parece deberse a que en estas condiciones se producía una excesiva entrada de  $\text{Na}^+$  que los mutantes no podían expulsar (Niu *et al.*, 1995). Adicionalmente, el mayor contenido en  $\text{K}^+$  del mutante *sos1-1* en parte aérea, junto con su menor concentración en la raíz, ponen en evidencia una alteración en el transporte de  $\text{K}^+$  a larga distancia. La principal proteína encargada de la descarga de  $\text{K}^+$  en el xilema es el canal rectificador de salida SKOR (*Stelar K<sup>+</sup> Outward Rectifier*), de expresión en el periciclo y en el parénquima de la estela de la raíz (Gaymard *et al.*, 1998, Lacombe *et al.*, 2000). El exceso de  $\text{Na}^+$  en la raíz del mutante *sos1-1* en medios con 1 mM de  $\text{K}^+$  y concentraciones moderadas de  $\text{Na}^+$  podría activar al canal SKOR por despolarización de las células parenquimáticas, provocando una mayor descarga de  $\text{K}^+$  en el xilema que se traduciría en un contenido de este catión mayor en la parte aérea y menor en la raíz. La toma de  $\text{K}^+$  a través del canal AKT1 supone un paso limitante aguas arriba de su carga en el xilema por SKOR. Esto explicaría que el doble mutante *akt1 x sos1* no muestre un mayor transporte de  $\text{K}^+$  a través del xilema, sino que los niveles de este catión en la parte aérea sean comparables a los medidos en el mutante simple *akt1-2*. Finalmente, es importante destacar el bajo contenido de  $\text{K}^+$  medido en la raíz del mutante *sos1-1* tratado con  $\text{Na}^+$  10 mM, menor incluso que el de *akt1-2* en estas mismas condiciones. El tratamiento salino más severo parece inducir en este caso no sólo un mayor transporte de  $\text{K}^+$  a larga distancia sino también una menor toma a través de la raíz, lo cual también explicaría que el contenido de  $\text{K}^+$  en parte aérea en este ensayo sea mucho menor que el observado en el tratamiento con

Na<sup>+</sup> 5 mM. Son muchos los mecanismos a través de los que la mayor concentración de Na<sup>+</sup> en el medio podría reducir la toma de K<sup>+</sup>: inhibición de su adquisición a través de AKT1, activación de canales de salida de Na<sup>+</sup> a través de los que se podría también expulsar K<sup>+</sup>, activación de la pérdida de K<sup>+</sup> a través de AKT1 por despolarización celular o incluso inducción de su recirculación floemática a través de AKT2 si el tratamiento indujera la acumulación de ABA (Pilot *et al.*, 2003; Qi y Spalding, 2004; Shabala *et al.*, 2006; Geiger *et al.*, 2009).

## D.2. Caracterización de un alelo de *SOS1* mutado en un aminoácido muy conservado.

El ácido aspártico que en AtSOS1 ocupa la posición 201 constituye un aminoácido muy conservado entre transportadores de Na<sup>+</sup>, como demuestra su papel en NhaA y PutP de *Escherichia coli* (Quick y Jung, 1998; Arkin *et al.*, 2007), NhaP1 de *Methanococcus jannaschii* (Hellmer *et al.*, 2003), PomA y PomB de *Vibrio cholerae* (Vorburger *et al.*, 2009) o NhaAV y NBA de *Vibrio alginolyticus* (Nakamura *et al.*, 1995b; Nakamura *et al.*, 2001), constituyendo en algunos de ellos el sitio de unión a este catión. A la vista de estos antecedentes, se especuló que este aminoácido también podría ser esencial para el transporte de Na<sup>+</sup> en SOS1. El alelo mutante *SOS1\_D201N* se construyó mediante mutagénesis dirigida por PCR y se caracterizó funcionalmente en la cepa de levadura AXT3K y el mutante *sos1-1* de Arabidopsis. La no supresión del fenotipo en levadura por parte de este alelo, tanto en solitario como en coexpresión con el complejo SOS2/SOS3, sugiere su esencialidad para la función del transportador de Na<sup>+</sup> (Figura R.1.10). La caracterización en planta produjo resultados similares: la no complementación por parte de este alelo de la línea mutante *sos1-1* de Arabidopsis a cualquier concentración de NaCl (Figuras R.1.12 y R.1.13), puesto que se vio acumulación del transcrito en las distintas líneas transgénicas (Figura R.1.11), demostró que el ácido aspártico que ocupa la posición 201 es esencial para la funcionalidad del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> SOS1 *in planta*.

El análisis de la secuencia de *SOS1* predijo que codificaba una proteína de 127 kDa, con 12 dominios transmembrana y una larga cola hidrofílica en el extremo carboxiterminal, situada presumiblemente en el citosol y de función prácticamente desconocida (Shi *et al.*, 2000). Aunque el alelo *SOS1\_D201N* se comportó como un alelo nulo para el transporte de Na<sup>+</sup>, podría conservar alguna otra función todavía sin identificar de este transportador. Por ello, este alelo sin actividad de intercambio catiónico pero que traduce una proteína con toda su estructura intacta se revela como una buena herramienta para descubrir otras funciones de la proteína SOS1 no relacionadas con el transporte de Na<sup>+</sup>. El mutante *sos1-1*, al igual que *rcd1-1*, muestra sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y resistencia a metil viológeno (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). Al no parecer estos fenotipos relacionados con el transporte de Na<sup>+</sup>, se postuló que el alelo *SOS1\_D201N* tratado con estos agentes oxidantes se comportaría como el alelo silvestre. Sin embargo, las plantas portadoras de este alelo mostraron el mismo fenotipo que las transformadas con el vector vacío (Figura R.1.14): presencia de hojas verdes y desarrollo de raíces secundarias frente a metil viológeno (a diferencia del control sobreexpresando SOS1,

con acumulación de antocianinas y detención en el desarrollo radical), y reducción del crecimiento al tratar con  $H_2O_2$ . Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del ácido aspártico en la posición 201 de SOS1 también para su implicación en el estrés oxidativo. Si bien no se conoce el mecanismo exacto por el que SOS1, mediante su interacción con RCD1, protege a las plantas del estrés oxidativo en el citoplasma, sí se ha propuesto un mecanismo que explica la relación entre funcionalidad de SOS1 y sensibilidad a metil viológeno. En *Arabidopsis*, las ROS producen la estabilidad del mRNA de SOS1 en respuesta a estrés salino (Chung *et al.*, 2008). La actividad de SOS1 alcaliniza el apoplasto y acidifica el citosol, activándose la NADPH oxidasa. Esta enzima produce iones superóxido en el apoplasto, que al ser degradados por la superóxido dismutasa generan ROS que pueden servir de señalizadores para estabilizar el mRNA de SOS1 en un feedback positivo. El metil viológeno es reducido por la NADPH oxidasa al radical libre PQ $\cdot$ . Éste se reoxidaría rápidamente en presencia de oxígeno, formando el ión superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), que al convertirse en  $H_2O_2$  enzimáticamente podría generar radicales libres hidroxilo ( $\cdot OH$ ). En el alelo mutado *SOS1\_D201N*, al igual que en *sos1-1*, la actividad de la NADPH oxidasa no se activaría, resultando en una menor producción de ROS y, por lo tanto, un menor daño celular. Por otra parte, el ecotipo Cvi de *Arabidopsis*, al igual que el mutante *rcd1-1*, muestra resistencia a metil viológeno y sensibilidad a  $O_3$  (Rao y Davis, 1999). Este ecotipo es capaz de percibir y responder a  $O_3$ , pero rápidamente muestra características asociadas a la muerte celular programada antes de la formación de lesiones por ozono, como sucede en *rcd1-1* (Overmyer *et al.*, 2000). Estos datos indican que podría haber una relación causal desconocida entre resistencia a metil viológeno y susceptibilidad a agentes oxidantes en el citoplasma como el  $H_2O_2$  o el  $O_3$ .

### D.3. Búsqueda de alelos hiperactivos de SOS1.

En la lucha contra el estrés salino, se ha utilizado frecuentemente la sobreexpresión de genes implicados en la halotolerancia, como los que codifican proteínas LEA, osmolitos, factores de transcripción DREB/CBF, proteínas reguladoras, enzimas implicadas en la degradación de ROS y proteínas reguladoras de transportadores iónicos (revisado en Lee *et al.*, 2007b). La manipulación de los propios transportadores iónicos se ha utilizado con menor frecuencia y produjo, en el caso de NHX1, resultados contradictorios al intentar reproducirse los experimentos en nuestro laboratorio (Aspe *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Leidi *et al.*, 2010; Barragán *et al.*, 2012). En cambio la sobreexpresión de SOS1 en plantas silvestres de *Arabidopsis* sí redujo la acumulación de  $Na^+$ , mejorando la supervivencia tanto en plántulas como en plantas adultas a elevadas concentraciones de este catión (Shi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2009). En el momento de iniciar la presente Tesis Doctoral, se había realizado en nuestro laboratorio un rastreo en levadura de una genoteca de cDNA de SOS1 mutagenizada aleatoriamente mediante su propagación en la cepa de *E. coli* XL1-Red para encontrar alelos cuya sobreexpresión mejorara la halotolerancia aportada por el alelo silvestre (Figura R.2.1). Esta genoteca se utilizó para, mediante la transformación de la cepa halosensible de levadura AXT3K, seleccionar las colonias capaces de crecer en medio AP suplementado con NaCl,

indicando la presencia de una mutación beneficiosa para su actividad. La posterior secuenciación y caracterización de los transformantes permitió distinguir dos clases de alelos hiperactivos: los que siendo activados por el complejo SOS2/SOS3 permitían a la levadura crecer a concentraciones de hasta 400 mM de Na<sup>+</sup> (clase I) y los que, de forma independiente del complejo, permitían a los transformantes sobrevivir en medios con concentraciones de hasta 800 mM de Na<sup>+</sup> (clase II) (Quintero *et al.*, 2011). El sistema de expresión heteróloga en levadura, por su facilidad y rapidez de manejo, ha sido muy utilizado en el estudio de transportadores de plantas (Dreyer *et al.*, 1999). En el caso particular de la ruta SOS, la coexpresión de las 3 proteínas ha permitido demostrar distintos aspectos de la regulación del antiportador SOS1 por el complejo SOS2/SOS3 (Quintero *et al.*, 2002). Sin embargo, a menudo los fenotipos observados en levadura no son extrapolables a la célula vegetal, ya que la planta es un organismo mucho más complejo que presenta tejidos diferenciados y por otra parte, la diferencia de componentes celulares entre ambas puede llevar a distintas modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales que alterarían la función de la proteína. Además, el objetivo de este trabajo era la caracterización de estos alelos en planta para en un futuro poder aplicar los resultados a especies de interés agronómico como el arroz. Por estos motivos se decidió caracterizar los alelos en *Arabidopsis*, para lo que se seleccionaron dos de clase I (*SOS1\_A399V* y *SOS1\_E261K*) y dos de clase II (*SOS1\_P985S* y *SOS1\_Δ998*).

La expresión del alelo silvestre *AtSOS1* bajo el promotor CaMV35s complementa la mutación *sos1-1*, suprimiendo el fenotipo de halosensibilidad severa de esta línea (Wu *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002). Además, como se ha indicado anteriormente, en plantas silvestres mejora su tolerancia a altas concentraciones de Na<sup>+</sup> (Shi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2009). Los 4 alelos seleccionados se clonaron en el vector de expresión en planta pBI321, que expresa el cDNA en el casete de expresión CaMV35s-NOS. Cuando se caracterizaron las líneas con fondo genético *sos1-1* transformadas con los distintos alelos en ensayos de salinidad moderada (Apartado R.2.1), se vio que los 4 eran capaces de complementar la mutación (Figuras R.2.2 a R.2.5), indicando la funcionalidad de las construcciones *in planta*. Aunque la elongación de la raíz en algunas líneas puntuales fue significativamente menor que en la línea control transformada con el alelo silvestre, puesto que el crecimiento fue también menor en ausencia de sal y la parte aérea mostró un fenotipo mucho menos severo que el control negativo transformado con el vector pBI321 vacío, se asumió que estas diferencias no indicaban complementación parcial de la mutación sino que se debían a la posición de los insertos. En cambio, los ensayos *in vitro* con estas construcciones en fondo silvestre Col-0 *g11* (Apartado R.2.3) no reprodujeron los fenotipos observados en levadura: los alelos *SOS1\_A399V*, *SOS1\_E261K* y *SOS1\_P985S* no mejoraron, en la mayoría de líneas individuales, el grado de halotolerancia aportado por la sobreexpresión del alelo silvestre (Figuras R.2.6 a R.2.8) y aunque el alelo *SOS1\_Δ998* sí produjo un ligero aumento en la tolerancia de la mayoría de líneas transformantes, ésta fue mucho menor que la observada en levadura (Figura R.2.9), seguramente debidos a los problemas derivados de la expresión heteróloga de proteínas que ya se han mencionado anteriormente. La mayoría de alelos de

clase II aislados en el rastreo en levadura codificaban proteínas truncadas en su extremo carboxiterminal, demostrando que los últimos 130 aminoácidos constituyen un dominio autoinhibitorio (Quintero *et al.*, 2011). El alelo de clase II con la mutación en una posición más aguas abajo aislado fue *SOS1\_K1005Z*, por lo que se comparó la halotolerancia de transformantes de levadura expresando delecciones en serie aguas arriba de esta mutación, acotándose el dominio autoinhibitorio a las secuencias **KEHRGLMSWPE** (aminoácidos 1005 a 1015) y **SERAMQLSIFGS** (1033 a 1044), donde los aminoácidos conservados se han señalado en negrita. En los mutantes de clase II, la pérdida del dominio autoinhibitorio mantendría a SOS1 constitutivamente activa. Sin embargo, puesto que la halotolerancia conferida por estos alelos en levadura es mayor que la obtenida al sobreexpresar las tres proteínas de la ruta SOS, podría existir algún mecanismo de regulación de SOS1 desconocido distinto del complejo SOS2/SOS3. Por otra parte, en el mismo rastreo se descubrió que la delección del extremo carboxiterminal a partir de la leucina 745 generaba una proteína con actividad prácticamente nula. Asimismo, las mutaciones *sos1-8* (*SOS1\_G777D*) y *sos1-9* (*SOS1\_G784E*) se traducían en proteínas de muy baja actividad incluso al eliminar el dominio autoinhibitorio (Shi *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2011). Todas estas mutaciones se encuentran contenidas en un dominio muy conservado que muestra ciertas similitudes con uno de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD, del inglés *Cyclic Nucleotide Binding Domain*) y que en AtSOS1 comprende los aminoácidos 745 a 997. Aunque se ha demostrado el papel de los nucleótidos cíclicos en la mejora de la halotolerancia (Maathuis y Sanders, 2001), no existen evidencias de su implicación en la regulación de SOS1. Interesantemente, este dominio exclusivo de SOS1 se encuentra entre las regiones homólogas de NHX8 y SOS1 y la cola hidrofílica, también ausente en NHX8 (An *et al.*, 2007; Quintero *et al.*, 2011). Mediante ensayos de doble híbrido en nuestro laboratorio (Quintero *et al.*, 2011), se ha demostrado que los dominios autoinhibitorio y CNBD son capaces de interactuar, sugiriendo que la unión de ambos mantiene a SOS1 inactiva. En el alelo mutante de clase II *SOS1\_Δ998*, la mayor halotolerancia observada en planta se podría explicar por la falta del dominio autoinhibitorio, que mantendría a SOS1 constitutivamente inactiva. En cambio, el alelo *SOS1\_P985S* no se comporta como un alelo hiperactivo al ser expresado en Arabidopsis. Este alelo, único de clase II que no codifica una proteína truncada en su extremo carboxiterminal, contiene la mutación en una prolina, aminoácido que produce disrupciones en la estructura secundaria de la proteína. La sustitución por serina permitiría la formación de una hélice  $\alpha$  o una lámina  $\beta$ , lo que alteraría el plegamiento de la proteína y posiblemente impediría la interacción de ambos dominios y con ello la autoinhibición del antiportador. El débil comportamiento de este alelo en planta sugiere que algún componente celular ausente en levadura inhibe esta alteración de la estructura secundaria, impidiendo su hiperactividad *in planta*.

Aunque numerosos ensayos de transporte demuestran que la proteína SOS1 es un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  con poca afinidad por otros cationes monovalentes como  $\text{K}^+$  o  $\text{Li}^+$  (Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002), el mutante *sos1-1* muestra también cierto grado de sensibilidad a este último catión, análogo del  $\text{Na}^+$  más tóxico que éste pero con el que comparte dianas de

toxicidad y transportadores (Wu *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 1999; Nublat *et al.*, 2001). Puesto que muchos antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  similares a AtSOS1 muestran afinidad también por  $\text{Li}^+$  en función de la presencia de ciertos dominios y aminoácidos, incluyendo OsSOS1 y TdSOS1, clonados en nuestro laboratorio, se decidió realizar experimentos para caracterizar los distintos alelos mutantes también frente a este otro catión (Apartado R.2.2). Tanto en ensayos de germinación (Figuras R.2.10 a R.2.13) como de cultivo en medio líquido (Figuras R.2.14 a R.2.17), varias de las líneas independientes transformadas con los 4 alelos produjeron un incremento en la halotolerancia mayor que el conseguido mediante la sobreexpresión del alelo silvestre, siendo en general mejores los resultados obtenidos con los alelos de clase I que con los de clase II. Aunque existen diferencias en el nivel de tolerancia a  $\text{Li}^+$  entre líneas transformadas con el mismo alelo, la cuantificación del nivel de expresión del transgén mediante RT-PCR semicuantitativa descarta que se deban a diferencias en la transcripción, por no haberse encontrado una correlación clara entre nivel de acumulación del mRNA correspondiente al transgén y la tolerancia a  $\text{Li}^+$  (Figuras R.2.14 (c) a R.2.17 (c)). La mayor tolerancia a  $\text{Li}^+$  mostrada por plantas silvestres sobreexpresando distintos alelos de SOS1 sugiere que la proteína SOS1 presenta cierta afinidad por este catión *in planta*. NHX8, el único transportador específico de  $\text{Li}^+$  que se conoce en Arabidopsis, no muestra alteraciones en su nivel de expresión en los mutantes *sos* (Gong *et al.*, 2001; An *et al.*, 2007) y el  $\text{K}^+$ , cuyo papel en el mantenimiento de la homeostasis iónica es sobradamente conocido (Niu *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2000; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu *et al.*, 2003; Gierth *et al.*, 2007), no constituye un sustrato de SOS1 como demuestran ensayos de transporte y experimentos en levadura (Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002), así como los tratamientos en medio hidropónico expuestos en el apartado R.1 de la presente Tesis, por lo que los fenotipos observados parecen debidos a la capacidad de SOS1 de transportar  $\text{Li}^+$ . La capacidad de SOS1 para utilizar el  $\text{Li}^+$  como sustrato se había subestimado hasta la fecha (Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002) porque posiblemente requiera proteínas reguladoras o sistemas de modificación post-transcripcional y post-traduccionales, ausentes tanto en proteolipasomas artificiales como en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La afinidad de SOS1 por  $\text{Li}^+$ , presumiblemente más baja que la mostrada por el  $\text{Na}^+$ , sería compensada por la mayor cantidad de esta proteína debida a su sobreexpresión constitutiva y, adicionalmente, a las mutaciones que la volverían más activa y/o afín por este catión tóxico.

Puesto que las plantas cultivadas *in vitro* reducen su tasa de transpiración y con ello su acumulación de iones en la parte aérea (Flowers, 2004), se realizó también la caracterización de los 4 alelos en medio hidropónico (Apartado R.2.4) para obtener un conocimiento más preciso de su contribución a la homeostasis iónica. El uso de solución suplementada con 1 mM de  $\text{K}^+$  permite determinar la posible implicación del antiportador SOS1 no sólo en la respuesta a estrés salino sino también en el mantenimiento de la homeostasis potásica. Nuevamente, mientras los 4 alelos mostraron mayor tolerancia que el control positivo en los tratamientos con  $\text{LiCl}$  20 mM, sólo la línea transformada con *SOS1 $\Delta$ 1998* aportó un mayor grado de halotolerancia en medio con  $\text{NaCl}$  120 mM (Figuras R.2.18 a R.2.22). La medida del contenido



en agua al final del tratamiento permitió cuantificar de una forma más clara estas diferencias en los fenotipos, validándose los resultados obtenidos *in vitro*.

Los contenidos de  $K^+$  fueron similares para todas las líneas y tratamientos (Figuras R.2.20 (b) y R.2.23 (b)), con una ligera reducción de su acumulación en las plantas tratadas con  $Na^+$  debido a la gran cantidad a la que este ión se añadió a la solución nutritiva (120 mM). La similitud de contenidos entre líneas descarta nuevamente el papel de *SOS1* en la adquisición de  $K^+$ , mientras que la similitud entre tratamientos demuestra que el efecto deletéreo de los mismos se debe a la toxicidad de los iones y no a su interferencia con la adquisición de  $K^+$ . Además, los contenidos de  $K^+$  se han utilizado para reducir las diferencias entre medidas individuales mediante la obtención de los cocientes  $K^+:Li^+$  y  $K^+:Na^+$ .

El menor contenido de  $Li^+$  en la parte aérea de las plantas sobreexpresando algún alelo de *SOS1* no sólo vuelve a demostrar la afinidad de la proteína por este catión *in planta*, sino también que la mejor tolerancia se consigue principalmente mediante su expulsión a través de la raíz y no su compartimentación en la parte aérea, posiblemente debido a que la baja concentración a la que se añade el  $Li^+$  no llega a saturar la capacidad de la raíz para expulsarlo (Figura R.2.20 (c) y R.2.23 (c)). En concordancia con el mejor comportamiento observado en varias de las líneas transformadas con los distintos alelos mutantes, la acumulación de  $Li^+$  fue en general menor en las líneas transformadas con estos alelos que en el control positivo sobreexpresando el alelo silvestre. En algunos casos, se pudo observar más claramente la mejor homeostasis iónica de algunas líneas al representar el cociente  $K^+:Li^+$  (Figura R.2.24 (a) y (c)).

El análisis de los contenidos en  $Na^+$  produjo resultados contradictorios al compararse los dos experimentos. En el experimento realizado con los alelos de clase I, la peor tolerancia a este catión mostró correlación con su mayor acumulación en las plantas transformadas con los alelos *SOS1\_A399V* y *SOS1\_E261K* (Figura R.2.20 (d)), lo que se aprecia más claramente al representar el cociente  $K^+:Na^+$  (Figura R.2.24 (b)). Las plantas transgénicas acumularon  $Na^+$  a niveles comparables a los de la línea silvestre Col-0 *g/1*, sugiriendo que estas mutaciones reducen la afinidad de la proteína por el  $Na^+$  en favor del  $Li^+$ . En el experimento realizado con los alelos de clase II, el tratamiento con  $Na^+$  120 mM produjo una reducción en la toma de  $K^+$  que fue ligeramente mayor que la observada en el experimento anterior, mientras las plantas tomaron una mayor cantidad de  $Na^+$ . Puesto que tanto la composición de los medios como la duración del tratamiento fueron iguales en ambos experimentos, estas diferencias podrían deberse a la distinta posición de las bandejas dentro de la cámara de cultivo, habiéndose aumentado en consecuencia la tasa de transpiración de las plantas y con ello la acumulación de  $Na^+$ , con efecto inhibitor sobre la toma de  $K^+$ . Debido a estas diferencias experimentales, los contenidos en  $Na^+$  fueron distintos a los del experimento realizado con los alelos de clase I (Figura R.2.23 (d)). La línea silvestre Col-0 *g/1* mostró un contenido en este catión menor que el control positivo sobreexpresando *SOS1* y los fenotipos de las líneas transformadas con los alelos de clase II (ligera halotolerancia para el alelo *SOS1\_Δ998* y sensibilidad para *SOS1\_P985S*) no se vieron correlacionados con la acumulación de este catión. La mayor

transpiración de las plantas, que como hemos visto produjo una reducción en el cociente  $K^+ : Na^+$ , podría haber facilitado la acumulación de  $Na^+$  a concentraciones letales en las líneas más sensibles antes de finalizar el tratamiento, mientras que las más resistentes acumularían este catión a menor velocidad y lo tolerarían en mayor concentración, creciendo durante más tiempo. A raíz de este dato, conviene analizar cuidadosamente los resultados obtenidos para los alelos de clase II, ya que aunque ambos muestran menor acumulación de  $Na^+$  que el control positivo, este menor contenido podría ser la causa de la mayor tolerancia observada en el mutante *SOS1* $\Delta$ 1998, que al igual que en levadura mostraría una mayor actividad antiportadora  $Na^+/H^+$  debido a la ausencia del dominio autoinhibitorio (Quintero *et al.*, 2011), mientras que el fenotipo de sensibilidad de *SOS1\_P985S* sugiere que, al igual que sucede en la línea silvestre, la acumulación de  $Na^+$  produce un colapso en la planta que le impide seguir creciendo y acumulando iones.

La búsqueda de alelos hiperactivos de *SOS1* también se abordó directamente *in planta*, mediante la transformación a gran escala de plantas silvestres de *Arabidopsis* con una genoteca de cDNA de *SOS1* mutagenizado aleatoriamente mediante su propagación en la cepa de *E. coli* XL1-Red y clonado en el vector de sobreexpresión controlada de cDNA pER8-GW (Papdi *et al.*, 2008). De una población de 900,000 semillas T1, se aislaron 150 líneas de plantas capaces de germinar en medio MS suplementado con NaCl 200 mM, de las cuales 7 mantuvieron el fenotipo al ser reevaluada su descendencia T2. Se amplificó el cDNA de *SOS1* con el que se había transformado cada una de las líneas seleccionadas y se purificó la banda para secuenciar el cDNA completo. En 5 de las 7 líneas (3, 15, 33, 72 y 77) se observó una mutación de la guanina en la posición 2020 a adenina, produciendo una transición del aminoácido valina a isoleucina en la posición 714. Ambos aminoácidos son hidrofóbicos, neutros y con cadenas laterales alifáticas ramificadas, diferenciándose sólo en el mayor tamaño de ésta en la isoleucina. Aunque son muy poco reactivos, la estructura rígida de sus cadenas laterales restringe la conformación que puede adoptar la cadena peptídica. Por otra parte la mutación se encuentra próxima al dominio putativo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD, del inglés *Cyclic Nucleotide Binding Domain*) (Quintero *et al.*, 2011). La sustitución de valina por isoleucina podría alterar la morfología de la proteína en la cercanía de esta región, dificultando la interacción de este dominio con el carboxiterminal autoinhibitorio y manteniendo a *SOS1* constitutivamente activa. La colección de mutantes podría haberse enriquecido artificialmente en esta mutación debido a la selección de distintas semillas provenientes del mismo evento de transformación o a una mayor proliferación de las células de *Agrobacterium* portadoras de esta construcción. En la línea número 5, la mutación de adenina a guanina produjo un cambio del ácido glutámico en la posición 261 a glicina. Este aminoácido, muy conservado en proteínas SOS y predeciblemente situado en el segmento transmembrana número 7, ya había sido aislado en el rastreo en levadura (Quintero *et al.*, 2011), resaltando su importancia en la función de la proteína. Mientras en el alelo seleccionado en levadura la carga positiva de este aminoácido se vio sustituida por la carga negativa de la lisina, en este caso se da una sustitución por un aminoácido pequeño y sin carga. Quizás estos cambios en la carga

de los aminoácidos determinen que, *in planta*, las proteínas mutantes muestren mayor afinidad por  $\text{Li}^+$  o  $\text{Na}^+$ . Finalmente, la línea número 26 contiene un cambio de timina por citosina en la posición 3163, mutando la fenilalanina de la posición 1055 a leucina. Aunque ambos aminoácidos son de carga neutra, la gran diferencia de tamaños entre las cadenas laterales sugiere un efecto estérico sobre la estructura de la proteína. Dada la posición de esta mutación en la cercanía del dominio autoinhibitorio carboxiterminal de SOS1 (Quintero *et al.*, 2011), la sustitución de fenilalanina por leucina podría impedir la interacción de este dominio con el dominio CNBD, manteniendo la proteína constitutivamente activa.



## VII CONCLUSIONES.

1. El fenotipo de sensibilidad a bajo  $K^+$  descrito para los mutantes *sos1* es condicional a la presencia de  $Na^+$  en el medio, comportándose éstos como la línea silvestre en ausencia de este catión.
2. El doble mutante *akt1 sos1* se comporta como un mutante simple *akt1* en ausencia de  $Na^+$  pero su fenotipo es más severo que el de ambos mutantes simples en presencia de este catión.
3. El fenotipo observado en el mutante *sos1* en medios pobres en  $K^+$  y presencia de  $Na^+$  no se debe a una menor acumulación de  $K^+$ , sino a una reducción en el cociente  $K^+:Na^+$ .
4. Aunque los 4 candidatos a alelos hiperactivos ensayados son capaces de complementar al mutante *sos1-1*, sólo *SOS1\_Δ998* es capaz de mejorar en la línea silvestre la halotolerancia conseguida mediante la sobreexpresión del cDNA de *SOS1*.
5. Los 4 alelos ensayados mejoraron en cierto grado la tolerancia de la línea silvestre a  $Li^+$ , siendo el efecto mayor para los alelos *SOS1\_A399V* y *SOS1\_E261K*.
6. En un rastreo realizado *in planta*, se aislaron por su mayor tolerancia a NaCl los alelos mutantes *SOS1\_E261G*, *SOS1\_V714I* y *SOS1\_F1055L*.
7. El ácido aspártico en la posición 201 de *SOS1* es esencial para la tolerancia a  $Na^+$  en mutantes halosensibles de levadura y Arabidopsis.
8. El alelo mutante *SOS1\_D201N* es también incapaz de suprimir los fenotipos del mutante *sos1-1* con respecto al estrés oxidativo.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van der Straeten, D., Peng, J., Harberd, N.P. (2006). Integration to plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91.
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P. Genschik, P. (2008a) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* **20**, 2117–2129.
- Achard, P., Renou, J.P., Berthome, R., Harberd, N.P. and Genschik, P. (2008b) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr. Biol.* **18**, 656–660.
- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., Hedrich, R. (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Lett.* **486**, 93-98.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.H., Fujii, H., Zheng, X. et al. (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol. Chem.* **281**, 37636–37645.
- Ahlfors, R., Lang, S., Overmyer, K., Jaspers, P., Brosché, M., Tauriainen, A., Kollist, H., Tuominen, H., Belles-Boix, E., Piippo, M., Inzé, D., Palva, E.T., Kangasjärvi, J. (2004). *Arabidopsis* RADICAL-INDUCED CELL DEATH 1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene and methyl jasmonate responses. *The Plant Cell.* **16**, 1925-1937.
- Ahn, S.J., Shin, R., Schachtman, D.P. (2004). Expression of *KT/KUP* genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K<sup>+</sup> uptake. *Plant Physiol.* **134**, 1135-1145.
- Albinsky, D., Masson, J., Bogucki, A., Afsar, K., Vass, I., Nagy, F., Paszkowski, J. (1999). Plant responses to genotoxic stress are linked to an ABA/salinity signalling pathway. *Plant J.* **17**, 73-82.
- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K., Kudla, J. (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca<sup>2+</sup>-regulated kinases. *EMBO Journal.* **20**, 1051-1063.
- Alcázar, R., Planas, J., Saxena, T., Zarza, X., Bortolotti, C., Cuevas, J., Bitrian, M., Tiburcio, A.F., Altabella, T. (2010). Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing the homologous arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 547–552.
- Ali, R., Brett, C.L., Mukherjee, S., Rao, R. (2004) Inhibition of sodium/proton exchange by Rab GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J. Biol. Chem.* **279**, 4498-4506.
- Ali, Z., Park, H.C., Ali, A., Oh, D.H., Aman, R., Kropornicka, A., Hong, H., Choi, W., Chung, W.S., Kim, W.Y., Bressan, R.A., Bohnert, H.J., Lee, S.Y., Yun, D.J. (2012). TsHKT1;2, a HKT1 homolog from the extremophile *Arabidopsis*-relative *Thellungiella salsuginea*, shows K<sup>+</sup>-specificity in the presence of NaCl. *Plant Physiol.*
- Allen, G.J., Sanders, D. (1994) Two voltage-gated calcium release channels coreside in the vacuolar membrane of guard cells. *Plant Cell* **6**, 685-694
- 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.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Schumacher, K., Shimazaki, C.T., Vafeados, D., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., Tsien, R.Y., Harper, J.F., Chory, J., Schroeder, J.I. (2000). Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science.* **289**, 2338-2342.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzmán, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* **301**, 1849.
- Amarashinge, V., Watson, L. (1989). Variation in salt secretory activity of microhairs in grasses. *Australian J. Plant Physiol.* **16**, 219-229.

- Amtmann, A., Jelitto, T.C., Sanders, D.** (1999). K<sup>+</sup>-selective inward-rectifying channels and apoplastic pH in barley roots. *Plant Physiol.* **120**, 331-338.
- Amtmann, A., Fischer, M., Marsh, E.L., Stefanovic, A., Sanders, D., Schachtman, D.P.** (2001). The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiol.* **126**, 1061-1071.
- An, R., Chen, Q.J., Chai, M.F., Lu, P.L., Su, Z., Qin, Z.X., Chen, J., Wang, X.C.** (2007). AtNHX8, a member of the monovalent cation: proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li/H antiporter. *Plant Journal.* **49**, 718-728.
- An Y.-Q., McDowell J.M., Huang S., McKinney E.C., Chambliss S., Meagher R.B.** (1996). Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant Journal.* **10**, 107-121.
- Anthony, R.G., Henriques, R., Helfer, A., Mészáros, T., Rios, G., Testerink, C., Munnik, T., Deák, M., Koncz, C., Bögre, L.** (2004). A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *EMBO J* **23**, 572-581.
- Apel, K., Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E.** (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science.* **285**, 1256-1258.
- Apse, M.P., Sottosanto, J.B., Blumwald, E.** (2003). Vacuolar cation/H<sup>+</sup> exchange, ion homeostasis and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *The Plant Journal* **36**, 229-236.
- Arisz, S.A., Testerink, C., Munnik, T.** (2009). Plant PA signalling via diacylglycerol kinase. *Biochim et Biophys Acta* **1791**, 869-875.
- Arkin I.T., Xu, H., Jensen M.Ø., Arbely, E., Bennett, E.R., Bowers, K.J., Chow, E., Dror, R.O., Eastwood, M.P., Flitman-Tene, R., Gregersen, B.A., Klepeis, J.L., Kolossváry, I., Shan, Y., Shaw, D.E.** (2007). Mechanism of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporting. *Science* **317(5389)**, 799-803.
- Armengaud, P., Breitling, R., Amtmann, A.** (2004). The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiol.* **136**, 2556-2576.
- 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.
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J.O., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Iturriaga, G.** (2004). The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology* **136**, 3649-3659.
- Axelsen, K.B., Palmgren, M.G.** (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**, 84-101.
- Azaizeh, H., Steudle, E.** (1991). Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays L.*) roots. *Plant Physiol.* **97**, 1136-1145.
- Bailey, J., Tyson-Capper, A.J., Gilmore, K., Robson, S.C., Europe-Finner, G.N.** (2005). Identification of human myometrial target genes of the cAMP pathway: the role of cAMP-response element binding (CREB) and modulator (CREM $\alpha$  and CREM $\tau$ 2 $\alpha$ ) proteins. *Journal Mol. Endocrinol.* **34**, 1-17.
- Balagué, C., Lin, B., Alcon, C., Flottes, G., Malmström, S., Köhler, C., Neuhaus, G., Pelletier, G., Gaymard, F., Roby, D.** (2003). HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell.* **15**, 365-379.
- Bañuelos, M.A., Klein, R.D., Alexander-Bowman, S.J., Rodríguez-Navarro, A.** (1995). A potassium transporter of the yeast *Saccharomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO Journal.* **14**, 3021-3027.
- 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.
- Barragán, V., Leidi, E.O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J.A., Cubero, B., Pardo, J.M.** (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*

- Bargmann, B.O., Laxalt, A.M., ter Riet, B., van Schooten, B., Merquiol, E., Testerink, C., Haring, M., Bartels, D., Munnik, T. (2009). Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants, *Plant Cell Physiol.* **50**, 78–89.
- Bassil, E., Ohto, M.A., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., Belmonte, M., Peleg, Z., Yamaguchi, T., Blumwald, E. (2011a). The Arabidopsis intracellular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *Plant Cell.* **23**, 224-239.
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.C., Ohto, M.A., Ushijima, K., Nakano, R., Esumi, T., Coku, A., Belmonte, M., Blumwald, E. (2011b). The Arabidopsis Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K<sup>+</sup> homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant Cell.* **23**, 3482-3497.
- Batelli, G., Verslues, P.E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K.S., Grillo, S., Zhu, J.K. (2007). SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol. Cell Biol.* **27**, 7781-7790.
- Baxter, I., Brazelton, J.N., Yu, D., Huang, Y.S., Lahner, B., Yakubova, E., Li, Y., Bergelson, J., Borevitz, J.O., Nordborg, M., Vitek, O., Salt, D.E. (2010). A coastal cline in sodium accumulation in Arabidopsis thaliana is driven by natural variation of the sodium transporter AtHKT1;1. *PLoS Genet.* **6(11)**, e1001193
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *C. R. Acad. Sci (Paris).* **316**, 1194-1199.
- Becker, D., Hoth, S., Ache, P., Wenkel, S., Roelfsema, M.R., Meyerhoff, O., Hartung, W., Hedrich, R. (2003). Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress. *FEBS Lett.* **554**, 119-126.
- Belin, C., Megies, C., Hauserová, E., López-Molina, L. (2009). Abscisic acid represses growth of the embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell* **21**, 2253-2268.
- Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Kushnir, S. (2000). CEO1, a new protein from Arabidopsis thaliana, protects yeast against oxidative damage. *FEBS Letters.* **482**, 19-24.
- Berthomieu, P., Conéjéro, 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., Very, A.A., Sentenac, H., Casse, F. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *Embo J.* **22**, 2004-2014.
- Benito, B., Rodríguez-Navarro, A. (2003). Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Psychomitrella patens*. *Plant Journal.* **36**, 382-389.
- Binzel, M.L., Hess, F.D., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1988). Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* **86**, 607-614
- Bhandal, I.S., Malik, C.P. (1988). Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *Intern Rev Cytol.* **110**, 205-254.
- Blaha, G., Stelzl, U., Spahn, C.M., Agrawal, R.K., Frank, J., Nierhaus, K.H. (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods Enzymol.* **317**, 292-309.
- Blatt, M.R., Gradmann, D. (1997). K<sup>+</sup>-sensitive gating of the K<sup>+</sup> outward rectifier in Vicia guard cells. *Journal Membr. Biol.* **158**, 241-256.
- Blount, P., Moe, P.C. (1999). Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function. *Trends Microbiol.* **7**, 420-424.
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol.* **12**, 431-434.
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends Biotech.* **14**, 89-97.
- Bohnert, H.J., Sheveleva, E. (1998). Plant stress adaptations, making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol.* **1**, 267-274.
- Booth, I.R., Louis, P. (1999). Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in Escherichia coli. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 166-169.
- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A. (2001). 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.
- Bouche, N., Fait, A., Bouchez, D., Moller, S.G., Fromm, H. (2003) Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gammaaminobutyrate shunt is required to restrict



- levels of reactive oxygen intermediates in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **100**, 6843–6848.
- Bowers, K., Levi, B.P., Patel, F.I., Stevens, T.H.** (2000) The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4277–4294.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H., Chua, N.H.** (1994). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*. **77**, 73-81.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., Gorchach, J.** (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*. **13**, 1499-1510.
- Bressler, E., Hoffman, G.C.** (1986). Irrigation management for soil salinity control: theories and tests. *Soil.Sci.Am.J.* **50**, 1552-1560.
- Brett, C.L., Tukaye, D.N., Mukherjee, S., Rao, R.** (2005). The yeast endosomal Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell*. **16**, 1396-1405.
- Brini, F., Hanin, M., Lumberras, V., Amara, I., Khoudi, H., Hassairi, A., Pagés, M., Masmoudi, K.** (2007). Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* **26**, 2017-2026.
- Brini, F., Yamamoto, A., Jlaiel, J., Takeda, S., Hobo, T., DinH, H.Q., Hattori, T., Masmoudi, K., Hanin, M.** (2011). Pleiotropic effects of the wheat dehydrin DHN-5 on stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **52**, 676-688
- Bullock, W.O., Fernández, J.M., Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\lambda$ -galactosidase selection. *Biotech.* **5**, 376-379.
- Bursens, S., Himanen, K., van de Cotte, B., Beeckman, T., Van Montagu, M., Inze, D.** (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**, 632-40.
- Bush, D.S.** (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **46**, 95-122.
- Campbell, S.A., Close, T.J.** (1997). Dehydrins: genes, proteins and association with phenotypic traits. *New Phytologist.* **137**, 61-74.
- Cao, Y., Ward, J.M., Kelly, W.B., Ichida, A.M., Gaber, R.F., Anderson, J.A., Uozumi, N., Schröder, J.I., Crawford, N.M.** (1995). Multiple genes, tissue specificity and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **109(3)**, 1093-1106.
- Capell, T., Bassie, L., Christou, P.** (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **101**, 9909–9914.
- Chen, T.H., Murata, N.** (2011) Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment* **34**, 1–20.
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Shigaki, T., Hirschi, K.D.** (2002). Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/cation antiporter. *Plant Physiol.* **128**, 1245-1254.
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Barkla, B.J., Shigaki, T., Hirschi, K.D.** (2003). The *Arabidopsis* cax1 mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *Plant Cell.* **15**, 347-364.
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Zhu, J.K., Hirschi, K.D.** (2004). The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J. Biol. Chem.* **279**, 2922-2926.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J., Luan S.** (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant Journal.* **52**, 223-229.
- Chérel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcone, C., Sentenac, H., Thibaud, J.B.** (2002). Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K<sup>+</sup> channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* **14**, 1133-1146.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.H., Hong, X., Agarwal, M. et al.** (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **17**, 1043–1054.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., 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.
- Choi, H.I., Park, H.J., Park, J.H., Kim, S., Im, M.Y., Seo, H.H., et al.** (2005). Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol* **139**, 1750-61
- Chrispeels, M.J., Crawford, N.M., Schroeder, J.I.** (1999). Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell.* **11**, 661-676.
- Chung, J.S., Zhu, J.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Shi, H.** (2008). Reactive oxygen species mediate Na<sup>+</sup>-induced SOS1 mRNA stability in Arabidopsis. *The Plant Journal.* **53**, 554-565.
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I.** (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 12043-12048.
- Clough, S.J., Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal.* **16**, 735-743.
- Counillon, L., Pouysségur, J.** (2000). The expanding family of eucaryotic Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Journal Biol. Chem.* **275**, 1-4.
- Cramer, G.R., Läuchli, A., Polito, V.S.** (1985). Displacement of Ca<sup>2+</sup> by Na<sup>+</sup> on the plasmalemma of root cells. *Plant Physiol.* **79**, 207-211.
- Cruz, R.T., Jordan, W.R., Drew, M.C.** (1992). Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Shorgum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiol.* **99**, 203-212
- Cuevas, J.C., Lopez-Cobollo, R., Alcázar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.F., Ferrando, A.** (2008). Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiology* **148**, 1094–1105.
- Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., Leigh, R.A.** (2003). Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *J. Exp. Bot.*
- Cushman, J.C., Bohnert, H.J.** (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol.* **3**, 117-124.
- Czempinski, K., Frachisse, J.M., Maurel, C., Barbier-Brygoo, H., Mueller-Roeber, B.** (2002). Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis 'two-pore' K<sup>+</sup> channel KCO1. *Plant Journal.* **29**, 809-820.
- Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H., Chérel, I.** (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *EMBO Journal.* **16(12)**, 3455-3463.
- Darley, C.P., Van Wuytsinkel, O.C., Van der Woude, K., Mager, K.H., de Boer, A.H.** (2000). *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Biochem. J.* **351**, 241-249.
- Davenport, R.J., Tester, M.** (2000). A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol.* **122**, 823-834.
- Davenport, R.J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., Tester, M.** (2007). The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment.* **30**, 497-507
- Deeken, R., Sanders, C., Ache, P., Hedrich, R.** (2000). Developmental and light-dependent regulation of a phloem-localised K<sup>+</sup> channel of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **23(2)**, 285-290
- Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., Sauer, N., May, S.T., Hedrich, R.** (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta* **216**, 334-344.
- Demidchik, V., Tester, M.** (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **128**, 379-387.
- Demidchik, V., Essah, P.A., Tester, M.** (2004). Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of Arabidopsis root cells. *Planta.* **219**, 167-175.
- Demidchik, V., Maathuis, F.J.** (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol.* **175**, 387-404.
- Dennison, K.L., Robertson, W.R., Lewis, B.D., Hirsch, R.E., Sussman, M.R., Spalding, E.P.** (2001). Functions of AKT1 and AKT2 potassium channels determined by studies of single and double mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 1012-1019.

- Desbrosses, G., Josselson, C., Rigas, S., Hatzopoulos, P., Dolan, L.** (2003). AKT1 and TRH1 are required during root hair elongation in *Arabidopsis*. *Journal Exp. Botany*. **54**, 781-788.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K., Neill, S.J.** (2001). Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol.* **126**, 1579-1587.
- DeWald, D.B., Torabinejad, J., Jones, C.A., Shope, J.C., Cangelosi, A.R., Thompson, J.E., Prestwich, G.D., Hama, H.** (2001). Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**, 759-769.
- Dill, A., and Sun, T.-p.** (2001). Synergistic de-repression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 777-785.
- Ding, L., Zhu, J.K.** (1997). Reduced Na<sup>+</sup> uptake in the NaCl-hypersensitive *sos1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **113**, 795-799.
- Ding, H., Zhang, A., Wang, J., Lu, R., Zhang, H., Zhang, J., Jiang, M.** (2009) Identity of an ABA-activated 46 kDa mitogen-activated protein kinase from *Zea mays* leaves: partial purification, identification and characterization. *Planta* **230**, 239-51.
- Doherty, C.J., Van Buskirk, H.A., Myers, S.J., Thomashow, M.F.** (2009) Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell* **21**, 972–984.
- Donaton, M.C., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Zeebroeck, G., Crauwels, M., Winderickx, J., Thevelein, J.M.** (2003) The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **50**, 911–929.
- Downey, P., Szabo, I., Ivashikina, N., Negro, A., Guzzo, F., Ache, P., Hedrich, R., Terzi, M., Schiavo, F.L.** (2000). KDC1, a novel carrot root hair K<sup>+</sup> channel. Cloning, characterization, and expression in mammalian cells. *J Biol Chem.* **275**, 39420-39426.
- Dreyer, I., Becker, D., Bregante, M., Gambale, F., Lehnen, M., Palme, K., Hedrich, R.** (1998). Single mutations strongly alter the K<sup>+</sup>-selectivity pore of the K(in) channel KAT1. *FEBS Letters.* **430(3)**, 370-376.
- Dreyer, I., Horeau, C., Lemaillet, G., Zimmermann, S., Bush, D.R., Rodríguez-Navarro, A., Schachtman, D.C., Spalding, E.P., Sentenac, H., Gaber, R.F.** (1999). Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *J. Exp. Bot.* **50**, 1073-1087.
- Dubcovsky, J., Santa María, G., Epstein, E., Luo, M.C., Dvořák, J.** (1996). Mapping of the K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> discrimination locus *Kna1* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 448-454.
- Duby, G., Hosy, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H., Thibaud, J.B.** (2008). AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K<sup>+</sup> channels. *Plant Journal.* **53**, 115-123.
- Dunham, P.B., Kelley, S.C., Lougue, P.J., Mutolo, M.J., Milanick, M.A.** (2005). Na<sup>+</sup>-inhibitory sites of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger are Li<sup>+</sup> substrate sites. *Ann. J. Physiol. Cell. Physiol.* **289**, C277-C282.
- Durell, S.R., Guy, H.R.** (1999). Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biophys. J.* **77**, 789-807.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C.** (1991) A simple and rapid method for the preparation of genomic plant DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**, 1349.
- Ehrhardt, T., Zimmerman, S., Müller-Röber, B.** (1997). Association of plant K(in) channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Letters.* **116**, 879-890.
- Elble, R.** (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeast. *BioTechniques.* **13**, 18-20.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., Ma, F.** (2003). Root endodermis and exodermis : structure, function and responses to the environment. *J. Plant Growth Regul.* **21**, 335-351.
- Epstein, E., Elzam, O.E., Rains, D.W.** (1963). Resolution of dual mechanism of potassium absorption by barley roots. *Proc Natl Acad Sci USA.* **49**, 684-692.
- Essah, P.A., Davenport, R., Tester, M.** (2003). Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**, 307-318.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T.** (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**:389-96.

- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., Fernie, A.R. (2008) Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science* **13**, 14–19.
- Feki, K., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Masmoudi, K. (2011). Regulation of wheat  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger *TdSOS1* by phosphorylation. *Plant Mol. Biol.* **76**, 545-556
- Fernando, M., Kulpa, J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D. (1990). Potassium-dependent changes in the expression of membrane-associated proteins in barley roots: I. correlations with  $\text{K}^+(\text{Rb}^+)$  influx and root  $\text{K}^+$  concentration. *Plant Physiol.* **92**, 1128-1132.
- Fisher, D.B., Cash-Clark, C.E. (2000). Gradients in water potential and turgor pressure along the translocation pathway during grain filling in normally watered and water-stressed wheat plants. *Plant Physiol.* **123**, 139-148.
- 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., Yeo, A.R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants. Where next? *Australian J. Plant Physiol.* **22**, 875-884.
- Flowers, T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot.* **55**, 307-319.
- Forment, J., Naranjo, M.A., Roldan, M., Serrano, R., Vicente, O. (2002). Expression of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *Plant J.* **30**, 511-519.
- Francis D. (2007). The plant cell cycle—15 years on. *NewPhytol* **174**, 261-78.
- Fu, H.H., Luan, S. (1998). AtKup1: a dual-affinity  $\text{K}^+$  transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **10**, 63-73.
- Fuchs, I., Stöltze, S., Ivashikina, N., Hedrich, R. (2005). Rice  $\text{K}^+$  uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress. *Planta.* **221**, 212-221.
- Fuglsang, A.T., Guo, Y., Cuin, T.A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K.A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., Palmgren, M.G., Zhu, J.K. (2007). Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell.* **19**, 1617-1634.
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK. (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell.* **19**, 485–494.
- Fujii, H., Zhu, J.K. (2009). An autophosphorylation site of the protein kinase SOS2 is important for salt tolerance in Arabidopsis. *Mol. Plant.* **458**, 613-619
- Fujibe, T., Saji, H., Arakawa, K., Yabe, N., Takeuchi, Y., Yamamoto, K.T. (2004) A methyl violongen-resistan mutant of *Arabidopsis*, which is allelic to ozone-sensitive *rcd1*, is tolerant to supplemental ultraviolet-B irradiation. *Plant Physiol.* **134**, 275-286
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M. et al. (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 3470–3488.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N. et al. (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **50**, 2123–2132.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H., Tanaka, Y. (2004). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* **45**, 146-159.
- Furumoto T, Yamaguchi T, Ohshima-Ichie Y, Nakamura M, Tsuchida-Iwata Y, Shimamura M, Ohnishi J, Hata S, Gowik U, Westhoff P, Bräutigam A, Weber AP, Izui K. (2011). A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature.* **476(7361)**, 472-475.
- Gajdanowicz, P., Michard, E., Sandmann, M., Rocha, M., Guedes-Corrêa, L.G., Ramírez-Aguilar, S.J., Gómez-Porras, J.L., González, W., Thibaud, J.B., Van Dongen, J.T., Dreyer, I. (2011). Potassium ( $\text{K}^+$ ) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* **108(2)**, 864-869.
- Galston, A.W., Sawhnet, R.K. (1990). Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* **89**, 1-4.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **1**, 151-158.
- Gao, M., Tao, R., Miura, K., Dandekar, A.M., Sugiura, A. (2001). Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Sci.* **160**, 837-845.
- García, A., Rizzo, C.A., Ud-Din, J., Bartos, S.L. Senadhira, D., Flowers, T.J., Yeo, A.R. (1997). Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in

- rice, and the mechanisms of sodium:potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant, Cell and Environment*. **20**, 1167-1174.
- García-Mata, C., Wang, J., Gajdanowicz, P., González, W., Hills, A., Donald, N., Riedelsberger, J., Amtmann, A., Dreyer, I., Blatt, M.R.** (2010). A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K<sup>+</sup> channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal Biol. Chem.* **285(38)**, 29286-29294.
- Garciadeblás, B., Senn, M.E., Bañuelos, M.A., Rodríguez-Navarro, A** (2003). Sodium transporters and HKT transporters: the rice model. *The Plant Journal*. **34**, 788-801.
- Garciadeblás, B., Haro, R., Benito, B.** (2007). Cloning of two SOS1 transporters from the seagrass *Cymodocea nodosa*. SOS1 transporters from *Cymodocea* and *Arabidopsis* mediate potassium uptake in bacteria. *Plant Mol. Biol.* **63**, 479-490.
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V., Wu, R.J.** (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **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 Nat Acad Sci USA*. **96**, 1480-1485.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., Fink, G.R.** (2001). Drought- and salt tolerant plants result from the overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 11444-11449.
- 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<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell*. **94**, 647-655.
- Geiger, D., Becker, D., Vosloh, D., Gambale, F., Palme, K., Rehers, M., Anschutz, U., Dreyer, I., Kudla, J., Hedrich, R.** (2009). Heteromeric AtKC1·AKT1 channels in *Arabidopsis* roots facilitate growth under K<sup>+</sup>-limiting conditions. *J. Biol. Chem.* **284**, 21288-21295.
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, et al.** (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 8023-8.
- Gelli, A., Blumwald, E.** (1993) Calcium retrieval from vacuolar pools. *Plant Physiol.* **102**, 1139-1146.
- Ghassemi, F., Jakeman, A.J., Nix, H.A.** (1995). Salinization of land and water resources. Human causes, extent, management and case studies. Sydney: University of New South Wales.
- Gierth, M., Mäser, P., Schroeder, J.I.** (2005). The potassium transporter AtHAK5 functions in K<sup>+</sup> deprivation-induced high-affinity K<sup>+</sup> uptake and AKT1 K<sup>+</sup> channel contribution to K<sup>+</sup> uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **137**, 1105-1114.
- Gierth, M., Mäser, P.** (2007). Potassium transporters in plants. Involvement in K<sup>+</sup> acquisition, redistribution and homeostasis. *Plant Physiol.* **137(3)**, 1105-1114.
- Gietz, R.D., Woods, R.D.** (2002). Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Methods Enzymol.* **350**, 87-96.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., Thomashow, M.F.** (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal*. **16**, 433-442.
- Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P. Everard, J.D. Thomashow, M.F.** (2000). Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* **124**, 1854-1865.
- Gisbert, C., Rus, A.M., Bolarín, M.C., López-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.
- Glass, A.D.** (1976). Regulation of potassium absorption in barley roots: an allosteric model. *Plant Physiol.* **58**, 33-37.
- 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.

- Gong, M., Li, Y.J., Chen, S.Z.** (1998). Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedling is mediated by calcium and associated with antioxidant system. *J. Plant Physiol.* **153**, 488-496.
- Gong, Z., Koiwa, H., Cushman, M.A., Ray, A., Bufford, D., Kore-eda, S., Matsumoto, T.K., Zhu, J., Cushman, J.C., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M.** (2001). Genes that are uniquely stress regulated in Salt Overly Sensitive (*sos*) mutants. *Plant Physiol.* **126**, 363-375.
- Gong, D., Zhang, C., Chen, X., Gong, Z., Zhu, J.K.** (2002). Constitutive activation and transgenic evaluation of the function of an Arabidopsis PKS protein kinase. *Dev. Cell.* **3**, 233-244.
- Gorham, J., Wyn-Jones, R.G., Bristol, A.** (1990). Partial characterization of the trait of enhanced K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> discrimination in the D genome of the wheat plant. *Planta.* **180**, 590-597.
- Granier, C., Inze, D., Tardieu, F.** (2000). Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34(*cdc2*) kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiol.* **124**, 1393-402.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., and Thomas, S.G.** (2006). Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 3399-3414.
- Groppa, M.D., Benavides, M.P.** (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**, 35-45.
- Gu, L., Liu, Y., Zong, X., Liu, L., Li, D.P., Li, D.Q.** (2010). Overexpression of maize mitogen-activated protein kinase gene, *ZmSIMK1* in Arabidopsis increases tolerance to salt stress. *Mol Biol Rep* **37**, 4067-73.
- Guan, L.M., Zha, J., Scandalios, J.G.** (2000). Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J.* **22**, 87-95.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., 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.
- 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., Qiu, Q.S., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Ohta, M., Zhang, C., Schumaker, K., Zhu, J.K.** (2004) Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell.* **16**, 435-449.
- Gupta, A.S., Heinen, J.L., Holaday, A.S., Burke, J.J. Allen, R.D.** (1993). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1629-1633.
- Guthrie, C., Fink, G.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* **194**, 795-823.
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J.L., Pineda, O., Thomashow, M.F., Zhang, J.Z.** (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **130**, 639-648.
- Halfter, U., Ishitani, M., 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. USA.* **97**, 3735-3740.
- Hall, D., Evans, A.R., Newbury, H.J., Pritchard, J.** (2006). Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in *Arabidopsis*. *Journal Exp. Bot.* **57**, 1201-1211.
- Hamada, A., Takashi, H., Tatsunosuke, N., Teruhiro, T.** (2001). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Synechocystis* species PCC 6803, homologous to SOS1, contains an aspartic residue and long C-terminal tail important for the carrier activity. *Plant Physiology.* **125**, 437-446.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hare PD, Cress WA.** (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**, 79-102.

- 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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 1099-1106.
- Hartje, S., Zimmermann, S., Klonus, D., Mueller-Roeber, B. (2000). Functional characterisation of LKT1, a  $\text{K}^+$  uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel SKT1 after expression in *Xenopus* oocytes. *Planta*. **210**, 723-731.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., Harper, J.F. (2000). CDPKs - a kinase for every  $\text{Ca}^{2+}$  signal? *Trends Plant Sci.* **5**, 154-159.
- Haro, R., Garcíadeblás, B., Rodríguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Letters*. **291**, 189-191
- Haro, R., Bañuelos, M.A., Senn, M.E., Barrero-Gil, J., Rodríguez-Navarro, A. (2005). HKT1 mediates sodium uniprot in roots. Pitfalls in the expresión of HKT1 in yeast. *Plant Physiol.* **139**, 1495-1506.
- 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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* **273**,1099-1106
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000). Plant Cellular And Molecular Responses To High Salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **51**, 463-499.
- Hedrich, R., Neimanis, S., Savchenko, G., Felle, H.H., Kaiser, W.M., Heber, U. (2001). Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to  $\text{CO}_2$ , malate, abscisic acid or interruption of water supply. *Planta*. **213**, 574-601.
- Hedrich, R., Kudla, J. (2006). Calcium signalling networks channel plant  $\text{K}^+$  uptake. *Cell*. **125(7)**, 1221-1223.
- Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratgé-Faillie, C., Offenborn, J.N., Lacombe, B., Dreyer, I., Thibaud, J.B., Kudla, J. (2011). Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Research*. **21(7)**, 1116-1130.
- Hellmer, J., Teubner, A., Zeilinger, C. (2003). Conserved arginine and aspartate residues are critical for function of MjNhaP1, a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter of *M. jannaschii*. *FEBS Letters*. **542**, 32-36.
- Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R., Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and  $(\cdot\text{O}_2^-)/\text{H}_2\text{O}_2$  production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* **127**, 817-831.
- Hernández, A., Jiang, X., Cubero, B., Nieto, P.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. Pardo, J.M. (2009). Mutants of the *Arabidopsis thaliana* cation/ $\text{H}^+$  antiporter AtNHX1 conferring increased salt tolerance in yeast: the endosome/prevacuolar compartment is a target for salt toxicity. *J. Biol. Chem.* **284**, 14276-14285.
- Hewitt, E.J., Notton, B.A. (1966). Effect of substituted uracil derivatives on induction of nitrate reductase in plants. *Biochem J.* **101**, 390-400.
- Higinbotham, N. (1973). Conceptual developments in membrane transport, 1924-1974. *Plant Physiol.* **54**, 454-462.
- Hincha, D.K. (2003) Effects of calcium-induced aggregation on the physical stability of liposomes containing plant glycolipids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1611**, 180-186.
- Hirayama, T., Ohto, C., Mizoguchi, T., Shinozaki, K. (1995). A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 3903-3907.
- 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.
- Hirschi, K.D. (1999). Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *Plant Cell*. **11**, 2113-2122.
- Holmström, K.O., Mantyla, E., Welin, B., Mandal, A., Palva, E. (1996). Drought tolerance in tobacco. *Nature*. **379**, 683-684.
- Holmström, K.O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T.E., Welin, B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J Exp Bot.* **51**, 177-185.

- Holsters, M., Waele, D.D., Depicker, A., Messens, E., Montagu, M.V., Schell, J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **163**, 181- 187.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P. (2000). Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* **122**, 1129-1136.
- Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S., Shinmyo, A. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* **27**, 129-138.
- Horie, T., Costa, A., Kim, T.H., Han, M.J., Horie, R., Leung, H.Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., Schroeder, J.I. (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. *EMBO J.* **26**, 3003-3014.
- Horie, T., Hauser, F., Schroeder, J.I. (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot plants. *Trends Plant Sci* **14**, 660-668.
- Horie, T., Brodsky, D.E., Costa, A., Kaneko, T., Lo Schiavo, F., Katsuhara, M., Schroeder, J.I. (2011). K<sup>+</sup> transport by the OsHKT2;4 from rice with atypical Na<sup>+</sup> properties and competition in permeation of K<sup>+</sup> over Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions. *Plant Physiol.* **156(3)**, 1493-1507.
- Hose, E., Clarkson, D.T., Steudle, E., Schreiber, L., Hartung, W. (2001). The exodermis: a variable apoplastic barrier. *J. Exp. Bot.* **52**, 2245-2264.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., Simonneau, T., Thibaud, J.B., Sentenac, H. (2003). The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**, 5549-5554.
- 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.
- Huang, J., Berkelman, T., Franklin, A.E., Hoffman, N.E. (1993). Characterization of a gene encoding a Ca<sup>2+</sup>-ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10066-10070.
- Hussain, A., Cao, D., Cheng, H., Wen, Z., and Peng, J. (2005). Identification of the conserved serine/threonine residues important for gibberellin-sensitivity of Arabidopsis RGL2 protein. *Plant J.* **44**: 88-99.
- Hussain, S.S., Ali, M., Ahmad, M., Siddique, K.H. (2011). Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* **29**, 300–311.
- Ichida, A.M., Pei, Z.M., Baizabal-Aguirre, V.M., Turner, K.J., Schröder, J.I. (1997). Expression of a Cs<sup>+</sup>-resistant guard cell K<sup>+</sup> channel confers Cs<sup>+</sup>-resistant, light-induced stomatal opening in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell.* **9**, 1843-1857.
- Ichikawa, T., Nakazawa, M., Kawashima, M., Iizumi, H., Kuroda, H. (2006). The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant Journal.* **48**, 974-985.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant Journal.* **24**, 655-665.
- Iordachescu, M., Imai, R. (2008) Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1223–1229.
- Ingram, J., Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* **122**, 747-756.
- 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. *The Plant Cell.* **12**, 1667-1677.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H.H., Hedrich, R. (2001). K<sup>+</sup> channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Lett.* **508**, 463-469.
- Ivashikina, N., Deeken, R., Fischer, S., Ache, P., Hedrich, R. (2005). AKT2/3 subunits render guard cell K<sup>+</sup> channels Ca<sup>2+</sup> sensitive. *J Gen Physiol.* **125**, 483-492.



- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. **27**, 325-333.
- Jabnourne, M., Espeout, S., Mieulet, D., Fizames, C., Verdeil, J.L., Conéjéro, G., Rodríguez-Navarro, A., Sentenac, H., Guiderdoni, E., Abdelly, C, Véry, A.E.** (2009). Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. *Plant Physiol.* **150(4)**, 1955-1971.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., Thomashow, M.F.** (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**, 104-106.
- James, R.A., Munns, R., von Caemmerer, S., Trejo, C., Miller, C., Condon, T.A.** (2006) Photosynthetic capacity is related to the cellular and subcellular partitioning of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in salt-affected barley and durum wheat. *Plant Cell Environ.* **29(12)**, 2185-2197.
- Jaspers, P., Brosché, M., Overmyer, K., Kangasjärvi, K.** (2010) The transcription factor interactin protein RCD1 contains a novel conserved domain. *Plant Signalling & Behavior*. **5:1** 78-80.
- Jiang, X., Leidi, E.O., Pardo, J.M.** (2010). How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signaling & Behavior*. **5:7**, 792-795.
- Johannes, E., Brosnan, J.M., Sanders, D.** (1992) Calcium channels in the vacuolar membrane of plants: Multiple pathways for intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **338**, 105-112.
- Johansson, I., Larsson, C., Ek, B., Kjellbom, P.** (1996). Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*. **10**, 451-459.
- Johansson, I., Wulfetange, K., Poree, F., Michard, E., Gajdanowicz, P., Lacombe, B., Sentenac, H., Thibaud, J.B., Mueller-Roeber, B., Blatt, M.R., Dreyer, I.** (2006). External K<sup>+</sup> modulates the activity of the *Arabidopsis* potassium channel SKOR via an unusual mechanism. *Plant J.* **46**, 269-281.
- 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. *Nature Biotech.* **17**, 287-291.
- Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Kim, K., Agarwal, M., Fu, X., Huang, A., Zhu, J.K.** (2006). The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress response in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103(49)** 18816-18821.
- Kato, Y., Sakaguchi, M., Mori, Y., Saito, K., Nakamura, T., Bakker, E.P., Sato, Y., Goshima, S., Uozumi, N.** (2001). Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the *Arabidopsis thaliana* Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K<sup>+</sup> transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 6488-6493.
- Kawakami, A., Sato, Y., Yoshida, M.** (2008) Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *Journal of Experimental Botany* **59**, 793–802.
- Kiegle, E., Moore, C.A., Haseloff, J., Tester, M.A., Knight, M.R.** (2000). Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant Journal*. **23**, 267-278.
- Killian, J.A., van Meer, G.** (2001). The 'double lives' of membrane lipids. Workshop: Anno 2000. A lipid milestone. *EMBO Rep.* **2**, 91-95.
- Kim, E.J., Kwak, J.M., Uozumi, N., Schroeder, J.I.** (1998). *AtKUP1*: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell*. **10**, 51-62.
- Kim, K.N., Cheong, Y.H., Grant, J.J., Pandey, G.K., Luan, S.** (2003). CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **15**, 411-423.
- 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.
- Kitsios, G., Doonan, J.H.** (2011). Cyclin dependent protein kinases and stress responses in plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 204-209.
- Kinclová, O., Potier, S., Sychrová, H.** (2002). Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H<sup>+</sup> antiporters into two subfamilies.

- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R.** (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant Journal*. **12**, 1067-1078.
- Knight, H., Knight, M.R.** (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* **6**, 262-267.
- Koncz, C., Shell, Z.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5' controls the tissue specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., Hilhorst, H.W., Karssen, C.M.** (1989). In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **90**, 463-469.
- 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. USA.* **97**, 2940-2945.
- Krasensky, J., Jonak, C.** (2011). Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **63**, 1593-1608.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Grisse, W., Luan, S.** (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 4718-4723
- Kwak, J.M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V.M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., Schroeder, J.I.** (2001). Dominant negative guard cell K<sup>+</sup> channel mutants reduce inward-rectifying K<sup>+</sup> currents and light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 473-485.
- Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H., Thibaud, J.B.** (2000a). pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. *FEBS Lett.* **466**, 351-354.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., Thibaud, J.B.** (2000b). A shaker-like K<sup>+</sup> channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **12**, 837-851.
- Lacombe, B., Becker, D., Hedrich, R., DeSalle, R., Hollmann, M., Kwak, J.M., Schroeder, J.I., Le Novère, N., Nam, H.G., Spalding, E.P., Tester, M., Turano, F.J., Chiu, J., Coruzzi, G.** (2001). The identity of plant glutamate receptors. *Science.* **292**, 1486-1487.
- Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S., Grignon, C.** (1996). Tissue-specific expression of *Arabidopsis* *AKT1* gene is consistent with a role in K<sup>+</sup> nutrition. *Plant J.* **9**, 195-203.
- Lam, H.-M., Chiu, J., Hsich, M.H., Meisel, L., Oliveira, I.C., Shin, M., Coruzzi, G.** (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature.* **396**, 125-126.
- 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.
- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J., Heard, P.J., Brown, S.J., Leigh, R.A.** (2002) A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant Journal.* **32**, 139-149.
- Lebaudy, A., Pascaud, F., Véry, A., Alcon, C., Dreyer, I., Thibaud, J.B., Lacombe, B.** (2009). Preferential KAT1-KAT2 heteromerization determines inward K<sup>+</sup> current properties in *Arabidopsis* guard cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 6265-6274.
- LeClere, S., Bartel, B.** (2001). A library of *Arabidopsis* 35s-cDNA lines for identifying novel mutants. *Plant Mol. Biol.* **46**, 695-703.
- Lecoeur Jrm, Wery J, Turc O, Tardieu Fo** (1995). Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *J Exp Bot* **46**, 1093-101.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., Peng, J.** (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* **16**:646-658.
- Lee, B.H., Henderson, D.H., Zhu, J.K.** (2005). The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1, *Plant Cell* **17**, 3155–3175.

- Lee, S.C., Lan, W.Z., Kim, B.G., Li, L., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Lu, G., Buchanan, B.B., Luan, S. (2007a). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 15959-15964.
- Lee, Y.P., Kim, S.H., Bang, J.W., Lee, H.S., Kwak, S.S., Kwon, S.Y. (2007b). Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Rep.* **26**, 591-598.
- Leidi, E.O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruíz, M.T., Cubero, B., Fernández, J.A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quintero, F.J., Pardo, J.M. (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant Journal*. **61**, 495-506.
- Leigh, R.A., Wyn-Jones, R.G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distributions and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol.* **97**, 1-13.
- 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., Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 199-222.
- Li, M., Jan, Y.L., Yan, L.Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science*. **257(5074)**, 1225-1230.
- Li, J-Y., Xu, L., Ma, J., Zhou, J., Zhang, F.C. (2004). Molecular cloning and expression analysis of AtNHX2 promoter. *Prog. Biochem. Biophys.* **31**, 1114-1118.
- Li, L., Kim, B.G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Luan, S. (2006). A Ca<sup>2+</sup> signalling pathway regulates a K<sup>+</sup> channel for low-K response in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 12625-12630.
- Li, H.J., Yang, A.F., Zhang, X.C., Gao, F., Zhang, J.R. (2007). Improving freezing tolerance of transgenic tobacco expressing sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase gene from *Lactuca sativa*. *Cell Tissue and Organ Culture* **89**, 37-48.
- Li, L., Liu, K., Hu, Y., Li, D., Luan, S. (2008). Single mutations convert an outward K<sup>+</sup> channel into an inward K<sup>+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 2871-2876.
- Li, H.T., Liu, H., Gao, X.S., Zhang, H. (2009). Knock-out of Arabidopsis *AtNHX4* gene enhances tolerance to salt stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 637-641.
- Li, H.W., Zang, B.S., Deng, X.W., Wang, X.P. (2011) Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OstTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* **234**, 1007-1018.
- Liang, F., Cunningham, K.W., Harper, J.F., Sze, H. (1997). ECA1 complements yeast mutants defective in Ca<sup>2+</sup> pumps and encodes an endoplasmic reticulum -type Ca<sup>2+</sup>-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 8579-8584.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**, 350-382.
- Ligterink, W., Hirt H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int. Rev. Cytol.* **201**, 209-275.
- Lin, J.J. (1995). Electrotransformation of *Agrobacterium*, in *Methods in Molecular Biology*, **47**, Nickoloff, J.A., ed., Humana Press, Totowa, NJ, 171.
- Lin, H., Yang, Y., Quan, R., Mendoza, I., Wu, Y., Du, W., Zhao, S., Schumaker, K.S., Pardo, J.M., Guo, Y. (2009). Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*. **21**, 1607-1619.
- Liotenberg, S., North, H., Marion-Poll, A. (1999). Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 341-350.
- Liu, J., Zhu, J.K. (1997). An Arabidopsis mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **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.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S., Zhu, J.K. (2000). The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 3703-3734.

- Liu, K., Li, L., Luan, S. (2006). Intracellular K<sup>+</sup> sensing of SKOR, a Shaker-type K<sup>+</sup> channel from *Arabidopsis*. *Plant J.* **46**, 260-268.
- Liu, H., Tang, R., Zhang, Y., Wang, C., Lv, Q., Gao, X., Li, W., Zhang, H. (2009). AtNHX3 is a vacuolar K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **33**, 1989-1999.
- Luan, S., Kudla, J., Rodríguez-Concepción, M., Yalovsky, S., Griesem, W. (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell.* **14**, 389-400.
- Ma, S.Y., Wu, W.H. (2007). AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. *Plant Mol Biol* **65**, 511-518
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. et al. (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**, 1064–1068.
- Maathuis, F., Verlin, D., Smith, F., Sanders, D., Fernandez, J., Walker, N. (1996). The physiological relevance of Na<sup>+</sup>-coupled K<sup>+</sup>-transport. *Plant Physiol.* **112**, 1609-1616.
- Maathuis, F., Amtmann, A. (1999). K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: The basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. *Ann Bot, London.* **84**, 123-133.
- Maathuis, F., Sanders, D. (2001). Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol.* **127**, 1617-1625.
- Maathuis, F. (2006) The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *Journal of Experimental Botany.* **57(5)**, 1137-1147.
- MacRobbie, E.A. (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **353**, 1475-1488.
- Maeda, T., Takekawa, M., Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science.* **269**, 554-558.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., Oda, K. (2004) Dwarf and delayed-flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J.* **37**, 720–729.
- Mahajan, S., Pandey, G.K., Tuteja, N. (2008). Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **471**, 146-158.
- Majee, M., Maitra, S., Dastidar, K.G., Pattnaik, S., Chatterjee, A., Hait, N.C., Das, K.P., Majumder, A.L. (2004) A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice: molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salt tolerance phenotype. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 28539–28552.
- Majerus, P.W. (1992). Inositol phosphate biochemistry. *Annu Rev. Biochem.* **61**, 225-250.
- Malmstrom, S., Askerlund, P., Palmgren, M.G. (1997) A calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup>-ATPase from plant vacuolar membranes with a putative regulatory domain at its N-terminus. *FEBS Lett.* **400**, 324-328.
- Mansour, M.M.F. (2000). Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum.* **43**, 491-500.
- Marcum, K.B. (1999). Salinity tolerance mechanisms of grasses in the subfamily chloridoideae. *Crop Sci.* **39**, 1153-1160.
- Marschner, H. (1995). 2<sup>nd</sup> Ed. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Marshall, J.G., Dumbroff, E.B., Thatcher, B.J., Martin, B., Rutledge, R.G., Blumwald, E. (1999). Synthesis and oxidative insolubilization of cell-wall proteins during osmotic stress. *Planta.* **208**, 401-408.
- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K.A., Hoshi, T., Hedrich, R. (1999). AKT3, a phloem-localized K<sup>+</sup> channel, is blocked by protons. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 7581-7586.
- Martin, T.F. (1998) Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 231-164.
- Martínez-Atienza, J., Jiang, X., Garcíadeblás, B., Mendoza, I., Zhu, J.K., Pardo, J.M., Quintero, F.J. (2007a). Conservation of the Salt Overly Sensitive pathway in rice. *Plant Physiol.* **143**, 1001-1012.
- Martínez-Atienza, J., Van Ingelgem, C, Roef, L., Maathuis, F. (2007b) Plant Cyclic Nucleotide Signalling. Facts and Fiction. *Plant Signaling & Behavior.* **2:6**, 540-543.

- Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V., Rubio, F.** (2005). High-affinity  $K^+$  uptake in pepper plants. *J Exp Bot.* **56**, 1553-1562.
- Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K. et al.** (2009) Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol.* **150**, 1972–1980.
- 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., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., Guerinot, M.L.** (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 1646-1667.
- 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., 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.
- McWorther, C.G., Paul, R.N., Outzs, J.C.** (1995). Bicellular trichomes of johnsongrass (*Sorghum halepense*) leaves. Morphology, histochemistry and function. *Weed Science.* **43**, 201-208.
- Medina, J., BARGUES, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M., Salinas, J.** (1999). The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.* **119**, 463-470.
- Melcher, K., Ng, L.M., Zhou, X.E., Soon, F.F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M. et al.** (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**, 602–608.
- Mian, A., Omen, R.J., Isayenkov, S., Sentenac, H., Maathuis, F.J., Véry, A.A** (2011). Overexpression of an  $Na^+$ - and  $K^+$ -permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. *Plant J.* **68**, 468-479.
- Mikami, K., Katagiri, T., Iuchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (1998). A gene encoding phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal.* **15**, 563-568.
- Miles GP, Samuel MA, Zhang Y, Ellis BE.** (2005) RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environ Pollut* **138**, 230-7.
- Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.J., Asano, A. et al.** (2009) Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462**, 609–614.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Yoshida, R., Shinozaki, K.** MAP kinase cascades in Arabidopsis: their roles in stress and hormone responses, in: Hirt H, (Ed.), Results and Problems in Cell Differentiation: MAP Kinases in Plant Signal Transduction, Heidelberg, Springer 2000;29-38.
- Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA.** (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* **41**, 546-66.
- Møller, I.S., William, M., Jha, D., Mayo, G.M., Roy, S.J., Coats, J.C., Haseloff, J., Tester, M.** (2009) Shoot  $Na^+$  exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of  $Na^+$  transport in Arabidopsis. *The Plant Cell.* **21**(7), 2163-2178.
- Monné, M., Nilsson, I., Johansson, M., Elmhed, N., von Heijne, G.** (1998). Positively and negatively charged residues have different effects on the position in the membrane of a model transmembrane helix. *J. Mol. Biol.* **284**, 1177-1183.
- Moon, H., Lee, B., Choi, G., Shin, D., Prasad, D.T., Lee, O., Kwak, S.S., Kim, D.H., Nam, J., Bahk, J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Cho, M.J., Lim, C.O., Yun, D.J.** (2003). NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 358-363.
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormatex, I., Fechilla, S., Klucas, R.V., Aparicio-Tejo, P.** (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta.* **194**, 346-352.

- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., et al. (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-Type anion and  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* **4**, 1749-62
- Munnik, T., Vermeer, J.E.M. (2010) Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositolphosphate signalling in plants. *Plant Cell Environ* **33**, 655-669.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **25**, 239-250.
- Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 651-681.
- Murashige, Y., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**, 473-497.
- Murtazina, R., Booth, B.J., Bullis, B.L., Singh, D.N., Fliegel, L. (2001). Functional analysis of polar amino-acid residues in membrane-associated regions of the NHE1 isoform of the mammalian  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4674-4685.
- Nakamura, R.L., McKendree, W.L., Hirsch, R.E., Sedbrook, J.C., Gaber, R.F., Sussman, M.R. (1995a). Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiol.* **109**, 371-374.
- Nakamura, H., Hakata, M., Amano, K., Miyao, A., Toki, N. (2007) A genome-wide gain-of-function analysis of rice genes using the FOX-hunting system. *Plant Mol. Biol.* **65**, 357-371.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1345–1363.
- Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y., Shinmyo, A. (2000). Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **122**, 1239-1247.
- Nass, R., Cunningham, K.W., Rao, R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**, 26145-26152.
- Newton, R.P., Smith, C.J. (2004) Cyclic nucleotides. *Phytochemistry.* **65**, 2423–2437.
- Nieves-Cordones, M., Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V., Rubio, F. (2007). An  $\text{NH}_4^+$ -sensitive component dominates high-affinity  $\text{K}^+$  uptake in tomato plants. *Plant Sci.* **172**, 273-280.
- Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., Rubio, F. (2010). The *Arabidopsis thaliana* HAK5  $\text{K}^+$  transporter is required for plant growth and  $\text{K}^+$  acquisition from low  $\text{K}^+$  solutions under saline conditions. *Molecular Plant.* **3**, 326-333.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.Y., Wang, A., Carvalho, P., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., Yates III, J.I., Schroeder, J.I. (2009). PYR/PYL/RAC family members are major in vivo ABI protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* **61**, 290-299.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S. (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* **147**, 1251–1263.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M. (1995). Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol.* **109**, 735-742.
- Nublat, A., Desplans, J., Casse, F. and Berthomieu, P. (2001) *sas1*, an *Arabidopsis* mutant overaccumulating sodium in the shoot, shows deficiency in the control of the root radial transport of sodium. *Plant Cell*, **13**, 125–137.
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., Hanson, A.D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 128-134.
- Oh, D.H., Leidi, E.O., Zhang, Q, Hwang, S.M., Li, Y., Quintero, F.J., Jiang, X., Paino d'Urzo, M., Lee, S.Y., Zhao, Y., Bahk, Y.D., Bressan, R.A., Yun, D.J., Pardo, J.M., Bohnert, H.J. (2009). Loss of halophytism by interference with SOS1 expression. *Plant Physiol.* **151**, 210-222.
- Oh, D.H., Lee, S.Y., Bressan, R.A., Yun, D.Y., Bohnert, H.J. (2010) Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. *Journal of Experimental Botany.* **61(4)**, 1205-1213.

- Ohta, M., Hayashi, Y., Nakashima, A., Hamada, A., Tanaka, A., Nakamura, T., Hayakawa, T. (2002). Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Letters*. **532**, 279-282.
- 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. USA*. **100**, 11771-11776.
- Olías, R., Eljakaoui, Z., Pardo, J.M., Belver, A. (2009). The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na<sup>+</sup> in tomato plants under salinity stress. *Plant Signaling & Behavior*. **4:10**, 973-976.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., Kangasjärvi, J. (2000). Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *The Plant Cell*. **12**, 1849-1862.
- Papazian, D.M., Schwartz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*. **237(4816)**, 749-753.
- Papdi, C., Ábrahám, E., Prathiba-Joseph, M., Popescu, C., Koncz, C., Szabados, L. (2008). Functional identification of *Arabidopsis* stress regulatory genes using the Controlled cDNA Overexpression System. *Plant Physiol*. **147**, 528-542.
- Pardo, J.M., Reddy, M.P., Yang, S., Maggio, A., Huh, G.H., Matsumoto, T., Coca, M.A., Koiwa, H., Yun, D.J., Watad, A.A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1998). Stress signalling through Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 9681-9686.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., Quintero, F.J. (2006). Alkali cation exchangers: roles on cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot*. **57**, 1181-1199.
- Park, E.J., Jeknic, Z., Chen, T.H., Murata, N. (2007). The codA transgene for glycinebetaine synthesis increases the size of flowers and fruits in tomato. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 422-430.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provat, N.J., Desveaux, D., Rodríguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F., Cutler, S.R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**, 1068-1071.
- Patharkar, O.R., Cushman, J.C. (2000). A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudo-response regulator. *Plant Journal*. **24**, 679-691.
- Patra, B., Ray, S., Richter, A., Majumder, A.L. (2010) Enhanced salt tolerance of transgenic tobacco plants by co-expression of PcINO1 and MclMT1 is accompanied by increased level of myo-inositol and methylated inositol. *Protoplasma* **245**, 143-152.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Zhang, Y.H. (2008) Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 417-441.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schröder J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*. **406**, 731-734.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. (1997). The *Arabidopsis* GAI gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev*. **11**: 3194-3205.
- Penson, S.P., Schuurink, R.C., Fath, A., Gubler, F., Jacobsen, J.V., Jones, R.L. (1996). cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell*. **8**, 2325-2333.
- Peterbauer, T., Richter, A. (2001) Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* **11**, 185-197.
- Philipp, K., Buchsenschutz, K., Abshagen, M., Fuchs, I., Geiger, D., Lacombe, B., Hedrich, R. (2003). The K<sup>+</sup> channel KZM1 mediates potassium uptake into the phloem and guard cells of the C4 grass *Zea mays*. *J Biol Chem*. **278**, 16973-16981.
- Philipp, K., Ivashikina, N., Ache, P., Christian, M., Lüthen, H., Palme, K., Hedrich, R. (2004). Auxin activates KAT1 and KAT2, two K<sup>+</sup>-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. **37**, 815-827.

- Pilon-Smits, E., Ebskamp, M., Paul, M.J., Jeuken, M., Weisbeek, P.J., Smeekens, S. (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* **107**, 125-130.
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Cherel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.B., Sentenac, H. (2001). Guard cell inward  $K^+$  channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *J Biol Chem.* **276**, 3215-3221.
- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Chérel, I., Sentenac, H. (2003). Regulated expression of *Arabidopsis* shaker  $K^+$  channel genes involved in  $K^+$  uptake and distribution in the plant. *Plant Mol Biol.* **51**, 773-787.
- Piñeros, M., Tester, M. (1997). Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology. *J. Exp. Bot.* **48**, 551-577.
- Pitzschke, A., Hirt, H. (2009). Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiol* **149**, 606-15.
- Platten J.D., Cotsaftis O., Berthomieu P., Bohnert H., Davenport R.J., Fairbairn D.J., Horie T., Leigh R.A., Lin H.X., Luan S., Mäser P., Pantoja O., Rodríguez-Navarro A., Schachtman D.P., Schroeder J.I., Sentenac H., Uozumi N., Véry A.A., Zhu J.K., Dennis E.S., Tester M. (2006) Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* **11(8)**, 372-374.
- Plett, D., Safwat, G., Gilliam, M., Møller, I.S., Roy, S., Shirley, N., Jacobs, A., Johnson, A., Tester, M. (2010) Improved salinity tolerance of rice through cell type-specific expression of AtHKT1;1. *PLoS One.* **5(9)**, e12571
- Plieth, C., Hansen, U.P., Knight, H., Knight, M.R. (1999). Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant Journal.* **18**, 491-497.
- Porée, F., Wulfetange, K., Naso, A., Carpaneto, A., Roller, A., Natura, G., Bertl, A., Sentenac, H., Thibaud, J.B., Dreyer, I. (2005). Plant K(in) and K(out) channels: approaching the trait of opposite rectification by analyzing more than 250 KAT1-SKOR chimeras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332(2)**, 465-473.
- Proft, M., Serrano, R. (1999). Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1 confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol. Cell Biol.* **19**, 537-546.
- 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.
- Pyo, Y.J., Gierth, M., Schroeder, J.I., Cho, M.H. (2010). High-affinity  $K^+$  transport in *Arabidopsis*: AtHAK5 and AKT1 are vital for seedling establishment and postgermination growth under low-potassium conditions. *Plant Physiol.* **153**, 863-875.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., Benfey, P.N. (1999). The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.* **18**: 111-119.
- Qi, Z., Spalding, E.P. (2004). Protection of plasma membrane  $K^+$  transport by the salt overly sensitive1  $Na^+-H^+$  antiporter during salinity stress. *Plant Physiol.* **136**, 2548-2555.
- Qi, Z., Stephens, N.R., Spalding, E.P. (2006). Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol.* **142**, 963-971.
- Qi, Z., Hampton, C.R., Shin, R., Barkla, B.J., White, P.J., Schachtman, D.P. (2008). The high affinity  $K^+$  transporter AtHAK5 plays a physiological role *in planta* at very low potassium concentrations and provides a caesium uptake pathway in *Arabidopsis*. *Journal Exp. Botany.* **59**, 595-607.
- Qiu, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., Zhu, J.K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane  $Na^+/H^+$  exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Nat Acad Sci USA.* **99**, 8436-8441.
- Qiu, Q.S., Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Zhu, J.K., Schumaker, K.S. (2003).  $Na^+/H^+$  exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**, 1041-1052.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J.M., Guo, Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *Plant Cell.* **19**, 1415-1431.



- Quan-Sheng, Q., Guo, Y., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Schumaker, K.S., Zhu, J.K. (2004). Regulation of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in *Arabidopsis thaliana* by the Salt-Overly-Sensitive (SOS) pathway. *Journal Biol. Chem.* **279**, 207-215.
- Quesada, V., García-Martínez, S., Piqueras, P., Ponce, M.R., Micol, J.L. (2002). Genetic architecture of NaCl tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **130**, 951-963.
- Quick, M., Jung, H. (1998). A conserved aspartate residue, Asp187, is important for Na<sup>+</sup>-dependent proline binding and transport by the Na<sup>+</sup>/proline transporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **37(39)**, 13800-13806.
- Quintero, F.J., Garcíadeblás, B., Rodríguez-Navarro, A. (1996). The SAL1 gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *The Plant Cell.* **8**, 529-537.
- Quintero, F.J., Blatt, M.R. (1997). A new family of K<sup>+</sup> transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS Lett.* **415**, 206-211.
- Quintero, F.J., Blatt, M.R., Pardo, J.M. (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Lett.* **471**, 224-228.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.K., Pardo, J.M. (2002). Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proc Nat Acad Sci USA.* **99**, 9061-9066.
- Quintero, F.J., Martínez-Atienza, J., Villalta, I., Jiang, X., Kim, W.Y., Ali, Z., Fujii, H., Mendoza, I., Yun, D.J., Zhu, J.K., Pardo, J.M. (2011). Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proc Nat Acad Sci USA.* **108(2)**, 2611-2616.
- Rae, L., Lao, N.T., Kavanagh, T.A. (2011) Regulation of multiple aquaporin genes in *Arabidopsis* by a pair of recently duplicated DREB transcription factors. *Planta.*
- Rains, D., Epstein, E. (1967). Sodium absorption by barley roots. Its mediation by mechanisms 2 of alkali cation transport. *Plant Physiol.* **42**, 224-228.
- Rao, M.V., Davis, K.R. (1999). Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant Journal.* **17**, 603-614.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K., Hedrich, R. (2002). AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel alpha-subunit, modulates root hair K<sup>+</sup> influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99(6)**, 4079-4084.
- Ren, Z.H., Gao, J.P., Li, L.G., Cai X.L., Huang, W. Chao D.Y., Zhu, M.Z., Zhang, 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.
- Renault, H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A., Deleu, C. (2010). The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology* **10**, 20.
- Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S.L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S.C., Grierson, C.S., Hirt, H., Knight, M.R. (2004). OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*, *Nature* **427**, 858-861
- Rhodes, D., Hanson, A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **44**, 357-384.
- Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K.A., Grabov, A., Dolan, L., Hatzopoulos, P. (2001). *TRH1* encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell* **13**, 139-151.
- Robinson, M.F., Véry, A.A., Sanders, D., Mansfield, T.A. (1997). How can stomata contribute to salt tolerance? *Ann. Bot.* **80**, 387-393.
- Rodríguez-Navarro, A., Ramos, J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **159**, 940-945.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1469**, 1-30.
- Rodríguez-Navarro, A., Rubio, F. (2006) High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1149-1160.
- Rodríguez-Rosales, M.P., Jiang, X., Gálvez, F.J., Aranda, M.N., Cubero, B., Venema, K. (2009) Overexpression of the tomato K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *LeNHX2* confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytol.* **179**, 366-377.
- Roxas, V.P., Smith, R.K., Jr., Allen, E.R., 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., Schroeder, J.I. (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*. **270**, 1660-1663.
- Rubio, F., Santa-Maria, G., Rodriguez-Navarro, A. (2000). Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum*. **109**, 34-43.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V. (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K<sup>+</sup>-uptake in the high affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum*. **134**, 598-608.
- Rubio F, Alemán F, Nieves-Cordones M, Martínez V. (2010). Studies on *Arabidopsis athak5, atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K uptake. *Physiologia Plantarum*. **139**, 220-228.
- Rus, A., Lee, B.H., Munoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (2004). AtHKT1 facilitates Na<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> nutrition in planta. *Plant Physiol*. **136**, 2500-2511.
- Rus, A., Baxter, I., Muthukumar, B., Gustin, J., Lahner, B., Yakubova, E., Salt, D.E. (2006). Natural Variants of AtHKT1 Enhance Na<sup>+</sup> Accumulation in Two Wild Populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*. **2**, 1964-1973.
- Sacks, M.M., Silk, W.K., Burman, P. (1997). Effect of Water Stress on Cortical Cell Division Rates within the Apical Meristem of Primary Roots of Maize. *Plant Physiol* **114**, 519-27.
- Saier, M.H.J. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microb Mol Biol Rev*. **64**, 354-411.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K., Izui, K. (2000). Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant Journal*. **23**, 319-327.
- Saito, H., Tatebayashi, K. (2004). Regulation of the Osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J. Biochem*. **136**, 267-272.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res Commun*. **290**, 998–1009.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, K., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K. et al. (2006a) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* **18**, 1292–1309.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006b) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress- and heat-stress-responsive gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 18822–18827.
- Salleh, F.M., Evans, K., Goodall, B., Machin, H., Mowla, S.B., Mur, L.A.J., Runions, J., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H., Rogers, H.J. (2012). A novel function for a redox-related LEA protein (*SAG21/AtLEA5*) in root development and biotic stress responses. *Plant, Cell & Environment*. **35**, 418–429
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sánchez-Barrena, M.J., Martínez-Ripoll, M., Zhu, J.K., Albert, A. (2005). The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *Journal Mol. Biol*. **345**, 1253-1264.
- Sánchez-Barrena, M.J., Fujii, H., Angulo, I., Martínez-Ripoll, M., Zhu, J.K., Albert, A. (2007). The structure of the C-terminal domain of the protein kinase SOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Mol. Cell*. **26**, 427-433.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F. (1999) Communicating with calcium. *The Plant Cell*. **11**, 691-706.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*. **14**, 401-417.
- Santa María, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., Rodríguez-Navarro, A. (1997). The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell*. **9**, 2281-2289.
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S.Y., Jamin, M. et al. (2009) The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462**, 665–668.

- Sato, Y., Sakaguchi, M.** (2005). Topogenic properties of transmembrane segments of *Arabidopsis thaliana* NHX1 reveal a common topology model of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger family. *J. Biochem.* **138**, 425-431.
- Schachtman, D.P., Tyerman, S.D., Terry, B.R.** (1991). The K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selectivity of a cation channel in the plasma membrane of root cells does not differ in salt-tolerant and salt-sensitive wheat species. *Plant Physiol.* **97**, 598-605.
- Schachtman, D.P., Kumar, R., Schröder, J.I., Marsh, E.L.** (1997). Molecular and functional characterisation of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 11079-11084.
- Schleyer, M., Bakker, E.P.** (1993). Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K<sup>+</sup>-uptake protein kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *J. Bacteriol.* **175**, 6925-6931.
- Schönknecht, G., Spoomaker, P., Steinmeyer, R., Brüggeman, L., Ache, P., Dutta, R., Reintanz, B., Godde, M., Hedrich, R., and Palme, K.** (2002). KCO1 is a component of the slow-vacuolar SV ion channel. *FEBS Lett.* **511**, 28-32.
- Schröder, J.I.** (1988). K<sup>+</sup> transport properties of K<sup>+</sup> channels in the plasma membrane of *Vicia faba* cells. *Journal Gen. Physiol.* **92**, 667-683.
- Schröder, J.I., Ward, J.M., Gassmann, W.** (1994). Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in higher plants: biophysical implications for K<sup>+</sup> uptake. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **23**, 441-471.
- Schröder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., Waner, D.** (2001). Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 627-658.
- Schumaker, K.S., Sze, H.** (1987). Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *J. Biol. Chem.* **262**, 3944-3946.
- Schuppler, U., He, P.H., John, P.C., Munns, R.** (1998). Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol.* **117**, 667-678.
- Schwake, M., Jentsch, T.J., Friedrich, T.** (2003). A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K<sup>+</sup>-channel assembly. *EMBO Reports.* **4**, 76-81.
- Schweighofer, A., Hirt, H., Meskiene, I.** (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* **9**, 236-243.
- Senn, M.E., Rubio, F., Banuelos, M.A., Rodríguez-Navarro, A.** (2001). Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. *J Biol Chem.* **276**, 44563-44569.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.M., Gaymard, F., Grignon, C.** (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science.* **256**, 663-665.
- Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y., Koshiba, T.** (2000). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 12908-12913.
- Serrano, R.** (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol.* **165**, 1-52.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Ríos, G., Márquez, J.A., Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizábal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C.** (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Botany* **50**, 1023-1036.
- Serrano, R., Rodríguez-Navarro, A.** (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 399-404.
- 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**, 1023-1036
- Shabala, S.** (2003). Regulation of potassium transport in leaves: from molecular to tissue level. *Ann Bot, London.* **92**, 627-634.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T.A., Smith, S.J., Miller, A.J., Davies, J.M., Newman, I.A.** (2006). Extracellular Ca<sup>2+</sup> ameliorates NaCl-induced K<sup>+</sup> loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K<sup>+</sup>-permeable channels. *Plant Physiol.* **141**, 1653-1665.
- Shabala, S., Cuin, T.A.** (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* **133**, 651-669.

- Shaul, O., Hilgemann, D.W., Almeida-Engler, J., Van Montagu, M., Inz, D., Galili, G.** (1999) Cloning and characterization of a novel  $Mg^{2+}/H^{+}$  exchanger. *EMBO J.* **18**, 3973-3980.
- Sheen, J.** (1996)  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science.* **13**, 1900-1902.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., McLean, M.D.** (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* **4**, 446-452.
- Shen, B., Jensen, R.G., Bohnert, H.J.** (1997). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.* **113**, 1177-1183.
- Sheveleva, E., Chmara, W., Bohnert, H.J., Jensen, R.G.** (1997). Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* **115**, 1211-1219.
- 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 USA.* **97**, 6896-6901.
- 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., 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., Lee, B.H., Wu, S.J., Zhu, J.K.** (2003). Overexpression of a plasma membrane  $Na^{+}/H^{+}$  antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol.* **21**, 81-85.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (1997). Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol.* **115**, 327-334.
- Silverstone, A.L., Mak, P.Y.A., Casamitjana Martínez, E., and Sun, T.-p.** (1997a). The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**: 1087-1099.
- Smirnoff, N.** (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation. *New Phytol.* **125**, 27-58.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J.** (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**, 1057-1060.
- Soderman, E.M., Brocard, I.M., Lynch, T.J., Finkelstein, R.R.** (2000). Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* **124**, 1752-1765.
- Song, A., Lu, J., Liang, J., Chen, S., Guan, Z., Fang, W., Chen, F.** (2012). Isolation and characterization of *Chrysanthemum crassum* *SOS1*, encoding a putative plasma membrane  $Na^{+}/H^{+}$  antiporter. *Plant Biol.* doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00560.x.
- Sottosanto, J.B., Gelli, A., Blumwald, E.** (2004). DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar  $Na^{+}/H^{+}$  antiporter: impact of *AtNHX1* on gene expression. *The Plant Journal.* **40**, 752-771.
- Sottosanto, J.B., Saranga, Y., Blumwald, E.** (2007). Impact of *AtNHX1*, a vacuolar  $Na^{+}/H^{+}$  antiporter, upon gene expression during short and long-term salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology.* **7**, 18-33.
- Spalding, E.P., Hirsch, R.E., Lewis, D.R., Qi, Z., Sussman, M.R., Lewis, B.D.** (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of *AKT1* channel activity: Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *J Gen Physiol.* **113**, 909-918.
- Stuedle, E.** (2000). Water uptake by roots: effects of water deficit. *J. Exp. Bot.* **51**, 1531-1542.
- 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. USA.* **94**, 1035-1040.
- Su, H., Gollack, 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.
- Su, H., Gollack, 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.
- Sun, T.-p., and Gubler, F.** (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**:197-223.

- 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<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* **44**, 928-938.
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouche, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I.N., Maathuis, F.J., Sanders, D., Bouchez, D., Fromm, H. (2000). Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* *CNGC1* gene confer Pb<sup>2+</sup> tolerance. *Plant J.* **24**, 533-542.
- Sussman, M.R., Harper, J.F. (1989) Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. *Plant Cell.* **1**, 953-960.
- Suzuki, N., Bajad, S., Shuman, J., Shulaev, V., Mittler, R. (2008) The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 9269–9275.
- Szabados, L., Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**, 89–97.
- Szabolcs, I. (1994). Soil salinization. Handbook of plant crop stress. Pressarkli, M. Ed. Marcel Dekker, New York, pp: 3-11.
- Szekely, G., Abraham, E., Cseplo, A., et al. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal* **53**, 11–28.
- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., Palme, K., Hedrich, R. (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 2917-2921.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **29**, 417–426.
- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J.K., Shinozaki, K. (2004). Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol.* **135**, 1697-1709.
- Takahashi, S., Katagiri, T., Hirayama, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2001). Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant Cell Physiol.* **42**, 214-222.
- Tamura, T., Hara, K., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H. (2003). Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol.* **131**, 454-462.
- Tarczynski, M.C., Jensen, R.G., Bonhert, H.J. (1992). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* **259**, 508-510.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., McInnes, R.R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acid Res.* **21**, 1677-1678.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dang, J.L., Hirt, H. (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signalling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.* **15**, 141-152.
- Tester, M., Leigh, R.A. (2001). Partitioning of nutrient transport processes in roots. *J Exp Bot.* **52**, 445-457.
- Tester, M., Davenport, R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann Bot*, London. **91**, 503-527.
- Testerink, C., Dekker, H.L., Lim, Z.Y., Johns, M.K., Holmes, A.B., Koster, C.G., Ktistakis, N.T., Munnik, T. (2004). Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants, *Plant J.* **39**, 527–536.
- Thevelein, J.M., Voordeckers, K. (2009). Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 2407-2414
- Thomashow, M.F. (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* **118**, 1-8.
- Thukral, S.K., Chang, K.K.H., Bitter, G.A. (1993). Functional expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods: a companion to Methods in Enzymology.* **5**, 86-95.

- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., Kobayashi, H.** (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell*. **11**, 1195-1206.
- Tyerman, S.D., Skerret, M.** (1999). Root ion channels and salinity. *Scientia Horticulturae*. **78**, 175-235.
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Sun, T.-p.** (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **135**: 1008-1019.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., Matsuoka, M.** (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698.
- Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., Paszkowski, J.** (2002). Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO Journal*. **21**, 6483-6493.
- Umezawa, T., Sugiyama, T., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki K., Isihama, Y., Hirayama, T., Shinozaki, K.** (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 17588-17593
- 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. USA*. **97**, 11632-11637.
- Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., Schroeder, J.I.** (2000). The *Arabidopsis* *HKT1* gene homolog mediates inward  $\text{Na}^+$  currents in *Xenopus laevis* oocytes and  $\text{Na}^+$  uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol*. **122**, 1249-1259.
- 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.
- Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Ito, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2004) *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 369–375.
- Valerio, C., Costa, A., Marri, L., Issakidis-Bourguet, E., Pupillo, P., Trost, P., Sparla, F.** (2011). Thioredoxin-regulated beta-amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 545–555.
- Venema, K., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Donaire, J.P.** (2002). The *Arabidopsis*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger *AtNHX1* catalyzes low affinity  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem*. **277**, 2413-2418.
- Venema, K., Belver, A., Marin-Manzano, M.C., Rodriguez-Rosales, M.P., Donaire, J.P.** (2003). A novel intracellular  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter related to  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters is important for  $\text{K}^+$  ion homeostasis in plants. *J Biol Chem*. **278**, 22453-22459.
- Verbruggen, N., Hermans, C.** (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **35**, 753–759.
- Verslues, P.E., Batelli, G., Grillo, S., Agius, F., Kim, Y.S., Zhu, J., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J.K.** (2007). Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalase reveals a point connection between salt stress and  $\text{H}_2\text{O}_2$  signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Biology*. **27(2)**, 7771-7780.
- Véry, A., Robinson, M., Mansfield, T., Sanders, D.** (1998). Guard cell cation channels are involved in  $\text{Na}^+$ -induced stomatal closure in a halophyte. *Plant J*. **14**, 509-521.
- Véry, A.A., Sentenac, H.** (2003). Molecular mechanisms and regulation of  $\text{K}^+$  transport in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*. **54**, 575-603.
- Vicente-Agullo, F., Rigas, S., Desbrosses, G., Dolan L., Hatzopoulos, P., Grabov, A.** (2004). Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal*. **40**, 523-535.
- Vijn, I., Smeekens, S.** (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* **120**, 351–359.

- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodríguez, P.L., Laurière, C., Merlot, S. (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the SNF1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 3170-3184.
- Volotovski, I.D., Sokolovski, S.G., Molchan, O.V., Knight, M.R. (1998) Second messengers mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* **117**, 1023-1030.
- Waditee, R., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., Inkaroensachdi, A., Takabe, T. (2001). Halotolerant cyanobacterium *Aphanotece halophytica* contains an Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, homologous to eukaryotic ones, with novel ion specificity affected by C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* **276**, 36931-36938.
- Walker, D.J., Leigh, R.A., Miller, A.J. (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Nat Acad Sci USA* **93**, 10510-10514.
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L., Fowke, L.C. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* **15**, 501-510.
- Wang, Y.H., Garvin, D.F., Kochian, L.V. (2002). Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiol.* **130**, 1361-1370.
- Wang, W., Li, Y., Zhang, Y., Yang, C., Zheng, N., and Xie, Q. (2007). Comparative expression analysis of three genes from the Arabidopsis vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (AtNHX) family in relation to abiotic stresses. *Chinese Science Bulletin* **52**, 1754-1763.
- Wang, J., Ding, H., Zhang, A., Ma, F., Cao, J., Jiang, M. (2010). A novel mitogen-activated protein kinase gene in maize (*Zea mays*), ZmMPK3, is involved in response to diverse environmental cues. *J Integr Plant Biol* **52**, 442-52.
- Ward, J.M., Schroeder, J.I. (1994) Calcium activated K<sup>+</sup> channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* **6**, 669-683
- Wegner, L.H., Raschke, K. (1994) Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots. *Plant Physiol* **105**, 799-813.
- Wegner, L.H., De Boer, A.H., Raschke, K. (1997). Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K<sup>+</sup> homeostasis and long-distance signaling. *Plant Physiol* **115**, 1707-1719.
- West, G., Inze, D., Beemster, G.T. (2004). Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. *Plant Physiol* **135**, 1050-8.
- White, P.J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1465**, 171-189.
- White, P.J., Bowen, H.C., Demidchik, V., Nichols, C., Davies, J.M. (2002). Genes for calciumpermeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim Biophys Acta.* **1564**, 299-309.
- Wieland, J., Nitsche, M., Strayle, J., Steiner, H., Rudolph, H.K. (1995). The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* **14**, 3870-3882.
- Wimmers, L.E., Ewing, N.N., Bennett, A.B. (1992) Higher plant Ca<sup>2+</sup>-ATPase: Primary structure and regulation of mRNA abundance by salt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9205-9209.
- Wu, S.J., Ding, L., Zhu, J.K. (1996). SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell.* **8**, 617-627.
- Wu, Y., Chen, Q., Chen, M., Chen, J., Wang, X. (2005). Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene. *Plant Sci.* **169**, 65-73.
- Wu Y., Ding N., Zhao X., Zhao M., Chang Z., Liu J., Zhang L. (2007). Molecular characterization of PeSOS1: the putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Populus euphratica*. *Plant Mol. Biol.* **65**, 1-11.
- Wyn-Jones, R.G., Pollard, A. (1983). Proteins, enzymes and inorganic ions. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series.*, A. Läuchli and R.L. Bielecki, eds. Springer-Verlag., Berlin, pp. 528-562.
- Xicluna, J., Lacombe, B., Dreyer, I., Alcon, C., Jeanguenin, L., Sentenac, H., Thibaud, J.B., Chérel, I. (2006). Increased functional diversity of plant K<sup>+</sup> channels by

- preferential heteromerization of the shaker-like subunits AKT2 and KAT2. *J. Biol. Chem.* **282**, (486-494).
- Xing, Y., Jia, W., Zhang, J.** (2007). AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of *CAT1* catalase by triggering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **58**, 2969-81.
- Xiong, L., Gong, Z., Rock, C.D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D., Zhu, J.K.** (2001). Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. *Dev. Cell.* **1**, 771-781.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J.K.** (2002). Cell signalling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell.* **14**, 165-183.
- Xiong, L., Zhu, J.K.** (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* **25**, 131-139.
- 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, H., Jiang, X., Zhan, K., Cheng, X., Chen, X., Pardo, J.M., Cui, D.** (2008). Functional characterization of a wheat plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 8-15.
- Xue, Z., Zhi, D., Xue, G., Zhang, H., Zhao, Y., Xia, G.** (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Sci.* **167**, 849-859.
- Xue, S., Yao, X., Luo, W., Jha, D., Tester, M., Horie, T., Schroeder, J.I.** (2011). AtHKT1;1 mediates nernstian sodium channel properties in *Arabidopsis* root stellar cells. *PLoS One* **6**(9), e24725.
- Yadav, R., Flowers, T., Yeo, A.** (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.* **19**, 329-336.
- Yamada, M., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Yoshida, Y.** (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1975–1981.
- Yamaguchi, T., Aharon, G.S., Sottosanto, J.B., Blumwald, E.** (2005). Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca<sup>2+</sup>- and pH-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**, 16107-16112.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., 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.
- Yang, Q., Cheng, Z.Z., Zhou, X.F., Yin, H.B., Li, X., Xin, X.F., Hong, X.H., Zhu, J.K., Gong, Z.** (2009). Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Plant.* **2**(1), 22-31.
- Yano, R., Nakamura, M., Yoneyama, T., Nishida, I.** (2005) Starch-related alpha-glucan/water dikinase is involved in the cold-induced development of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**, 837–846.
- Yao, X., Horie, T., Xue, S., Leung, H.Y., Katsuhara, M., Brodsky, D.E., Wu, Y., Schroeder, J.I.** (2010) Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 transporters in plant cells. *Plant Physiol.* **152**(1), 341-355.
- 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. Botany.* **38**, 1141-1153.
- Yeo, A.R., Flowers, S.A., Rao, G., Welfare, K., Senanayake, N., 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.
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y. et al.** (2009) Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1230–1236
- Yokoi, S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M.** (2002a). Salt Stress Tolerance of Plants. JIRCAS Working Report, 25-33.
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M.** (2002b). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant J.* **30**, 529-539.



- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J. et al. (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J.* **61**, 672–685.
- Yuasa, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Shinozaki, K. (2001). Oxidative stress activates ATMPK6, an *Arabidopsis* homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1012-1016.
- Zentella, R., Zhang, Z.L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., Sun, T.P. (2007). Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3037-3057.
- Zhang, H.X., 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 USA.* **98**, 12832-12836.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., Wang, X. (2004). Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9508–9513.
- Zhang, H., Kim, M.S., Sun, Y., Dowd, S.E., Shi, H., Paré, P.W. (2008). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21(6)**, 737-744.
- Zhao, Z., Chen, G., Zhang, C. (2001). Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.* **124**, 941-948.
- Zhao, R., Sun, H.L., Mei, C., Wang, X.J., Yan, L., Liu, R., et al. (2011). The *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth. *New Phytol* **192**, 61-73
- 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**, 1181-1192.
- Zhu, J.K. (2000) Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**, 941-948.
- Zhu, J.K. (2001a). Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol.* **4**, 401-406.
- Zhu, J.K. (2001b). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**, 66-71.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **53**, 247-273.
- Zhu, J.K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol.* **6**, 441-445.
- Zhu, J., Fu, X., Koo, Y.D., Zhu, J.K., Jenney, F.E., Adams, M.W.W., Zhu, Y., Shi, H., Yun, D.J., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (2007). An enhancer mutant of *Arabidopsis salt overly sensitive 3* mediates both ion homeostasis and the oxidative stress response. *Molecular and Cellular Biology.* **27(14)**, 5214-5224.
- Zhu, S.Y., Yu, X.C., Wang, X.J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.C., et al. (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 3019-36
- Zimmerman, A.L. (2004). Capturing ion channel gating: a little salt on the tail does the trick. *Journ. Gen. Physiol.* **124**, 627-629.
- Zimmermann S., Talke I., Ehrhardt T., Nast G., Müller-Röber B. (1998) Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiol.* **117**, 805-810.
- Zou, J.J., Wei, F.J., Wang, C., Wu, J.J., Ratnasekera, D., Liu, W.X., et al. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca<sup>2+</sup>-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol* **154**, 1232-43
- Zuo, J., Niu, QW, Chua, N.H. (2000). Technical advance: an estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant Journal.* **24**, 265-273.

## ANEXO 1

### Abreviaturas.

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>ABRE</b>	Elementos de respuesta a ácido abscísico
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>cAMP</b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>CBL</b>	del inglés, <i>Calcineurin B-Like</i>
<b>CDK</b>	Kinasas dependientes de ciclinas
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CDPK</b>	Protein-kinasas dependientes de calcio
<b>cGMP</b>	Monofosfato de guanosina cíclico
<b>CIPasa</b>	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
<b>CIPIK</b>	del inglés, <i>CBL-Interacting Protein Kinase</i>
<b>CNGC</b>	Canales activados por nucleótidos cíclicos
<b>Col-0</b>	Arabidopsis thaliana cv Columbia silvestre
<b>COS</b>	Sobreexpresión controlada de cDNA
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DF</b>	Deferoxamina
<b>DMTV</b>	Dimetiltiourea
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato dATP+dCTP+dGTP+dTTP
<b>DPI</b>	Yodonio de difenileno
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DRE</b>	Elementos de respuesta a deshidratación
<b>EDTA</b>	Ácido etilén-diaminotetraacético
<b>EMS</b>	Etilmetanosulfonato
<b>EST</b>	del inglés, <i>Expressed Sequence Tags</i>
<b>FOX</b>	Sobreexpresión de cDNA completo
<b>g</b>	Gramos o fuerza de la gravedad
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GLR</b>	Canales activados por glutamato
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>GUS</b>	$\beta$ -glucuronidasa
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trifosfato de inositol
<b>IRGA</b>	Analizador infrarrojo de gases
<b>kb</b>	Kilobases
<b>KIRC</b>	del inglés, <i>K<sup>+</sup> Inward Rectifying Channel</i>
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>l</b>	Litros
<b>LB</b>	Medio de cultivo <i>Lysogenic Broth</i>
<b>LEA</b>	del inglés, <i>Late Embryogenesis Abundant</i>
<b>M</b>	Molar
<b>MAPK</b>	del inglés, <i>Mitogen Activated Protein-Kinase</i>
<b>MES</b>	Ácido 2-[N-morfolino]etano-sulfónico
<b>mg</b>	Miligramos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MOPS</b>	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>MS</b>	Medio Murashige-Skoog para el cultivo de

<b>mV</b>	plantas
<b>MV</b>	Milivoltios
<b>NADPH</b>	Metilviológeno
<b>nm</b>	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
<b>nM</b>	Nanómetros
<b>NSC</b>	Nanomolar
<b>NSCC</b>	Sensores neuronales de calcio
<b>ORF</b>	Canales de cationes no selectivos
<b>p/v</b>	Marco abierto de lectura
<b>PAR</b>	Peso por volumen
<b>pb</b>	Radiación fotosintéticamente activa
<b>PCR</b>	Pares de bases
<b>PEG</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Pfu</b>	Polietilenglicol
<b>PLATE</b>	Polimerasa de DNA de alta fidelidad de la bacteria <i>Pyrococcus furiosus</i>
<b>PI-PLC</b>	Solución para transformación de levaduras con PEG, acetato de litio, Tris-HCl y EDTA
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa C activa
<b>QTL</b>	4,5-difosfato de fosfatidilinositol
<b>RH</b>	Loci de caracteres cuantitativos
<b>RNA</b>	Humedad relativa
<b>RNAasa</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Ribonucleasa
<b>rpm</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RT-PCR</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAR</b>	PCR de transcripción reversa
<b>SDS</b>	Respuesta sistémica adquirida
<b>SEM/EDX</b>	N-dodecil sulfato sódico
<b>SRS</b>	Microscopía electrónica de barrido con energía dispersiva de rayos X
<b>Taq polimerasa</b>	del inglés, <i>Sos Recruitment System</i>
<b>TBE</b>	Polimerasa de DNA de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TE</b>	Tampón Tris-Bórico-EDTA para electroforesis de DNA
<b>Tm</b>	Tris-EDTA
<b>Tris</b>	Temperatura media de hibridación del oligonucleótido
<b>U</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>UV</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>V</b>	ultravioleta
<b>v/v</b>	Voltios
<b>YNB</b>	Volumen por volumen
<b>YPD</b>	Medio Yeast-Nitrogen-Base para el cultivo de levaduras
<b>µg</b>	Medio Yeast-Peptone-Dextrose para el cultivo de levaduras
<b>µl</b>	Microgramos
<b>µM</b>	Microlitros
	Micromolar

## ANEXO 2

### Oligonucleótidos utilizados.

#### I. PCR DIAGNÓSTICA

Oligonucleótido	secuencia	Punto de hibridación	GEN/Vector
<b>sos1-1_f</b>	5'ATTGCATCAGTTATTTGGCTCAAGT3'	+1260	<i>AtSOS1</i>
<b>sos1-1_r</b>	5'TACAAAGAGAATATCTTAGCACAGG3'	+1403	<i>AtSOS1</i>

Oligonucleótidos utilizados para distinguir el alelo mutante *sos1-1* del alelo silvestre *SOS1* mediante la amplificación de una banda de 130 o 144 pb respectivamente en el DNA genómico.

<b>AKT1_f</b>	5'CAAGAAGGAACCAAGAACGC3'	+1480	<i>AtAKT1</i>
<b>AKT1_r</b>	5'ACTTGACGACTAAAGCTCCC3'	+754	<i>AtAKT1</i>

Oligonucleótidos utilizados para ampliar una banda de 727 pb únicamente en el alelo silvestre de *AKT1*.

<b>LBb1.3</b>	5'ATTTTGCCGATTCGGAACC3'	+6338	pROK2
---------------	-------------------------	-------	-------

Oligonucleótido que hibrida en el borde izquierdo del T-DNA de pROK2. Utilizado con *AKT1\_r*, amplifica una banda de 354 pb únicamente en el alelo silvestre *akt1-2*.

<b>CaMV35S_f</b>	5'CGGATTCCATTGCCAGCTATCTG3'	+5500	pBI321
<b>SOSDN_r</b>	5'CAATCGCCGTCCATTATTCATCAGGGATT <b>C</b> 3'	+617	<i>AtSOS1</i>

Oligonucleótidos utilizados para amplificar una banda de 650 pb en el extremo aminoterminal del cDNA de *SOS1*. *SOSDN\_r* porta la mutación en la posición 601 (señalada en negrita) que cambia el codón GAT (ácido aspártico) por AAT (asparagina).

<b>SOS1Xho_f</b>	5'CGGTTACATTGAAAACCTCGAGAA3'	+2065	<i>AtSOS1</i>
<b>NOSTerm_r</b>	5'CATCGCAAGACCGGCAACAGGATT3'	+5982	pBI321

Oligonucleótidos utilizados para amplificar una banda de 1.5 kb en el extremo carboxiterminal del cDNA de *SOS1*.

<b>NPTII-5'</b>	5'GGAGAGGCTATTCGGCTATG3'	+48	<i>NPTII</i>
<b>NPTII-3'</b>	5'GATATTCGGCAAGCAGGCATC3'	+598	<i>NPTII</i>

Oligonucleótidos utilizados para amplificar 571 pb del gen *NPTII*, gen que confiere resistencia a kanamicina y que es el marcador incluido en el plásmido pBI321.

#### II. RT-PCR

Oligonucleótidos	secuencia	Punto de hibridación	cDNA
<b>SOS1Xho_f</b>	5'CGGTTACATTGAAAACCTCGAGAA3'	+2065	<i>AtSOS1</i>
<b>NOSTerm_r</b>	5'CATCGCAAGACCGGCAACAGGATT3'	+5982	pBI321

Oligonucleótidos utilizados para amplificar una banda de 1.5 kb en el extremo carboxiterminal del cDNA de *SOS1*.

<b>SOS1B_f</b>	5'ATTGGTTTATTATTAGAAGGAT3'	+2713	<i>AtSOS1</i>
<b>NOSTerm_r</b>	5'CATCGCAAGACCGGCAACAGGATT3'	+5982	pBI321

Oligonucleótidos utilizados para amplificar una banda de 0.7 kb en el extremo carboxiterminal del cDNA de *SOS1*.

<b>998BamHI_f</b>	5'TCTATGGATCCCAGCTTCAGAGATCATTT3'	+2992	<i>AtSOS1</i>
<b>NOSTerm_r</b>	5'CATCGCAAGACCGGCAACAGGATT3'	+5982	pBI321

Oligonucleótidos utilizados para amplificar una banda de 0.4 kb en el extremo carboxiterminal del cDNA de *SOS1*.

<b>TB4-5'</b>	5'CAGTGTCTGTGATATTGCACC3'	+1053	$\beta$ -TUBULINA-4 (TB4)
<b>TB4-3'</b>	5'GACAACATCTTAAGTCTCGTA3'	+1324	$\beta$ -TUBULINA-4 (TB4)

Oligonucleótidos utilizados para amplificar un fragmento de 292 pb del cDNA del gen  $\beta$ -TUBULINA-4, que se usó como control del cDNA en las reacciones RT-PCR realizadas a las plantas de *Arabidopsis*.

<b>ACT8_f</b>	5'AGTGGTCGTACA ACCGGTATTGT3'	+646	ACTINA-8 (ACT8)
<b>ACT8_r</b>	5'GAGGATAGCATGTGGAAGTGAGAA3'	+719	ACTINA-8 (ACT8)

Oligonucleótidos utilizados para amplificar un fragmento de 195 pb del cDNA del gen *ACTINA-8* (*ACT8*) que se usó como control del cDNA en las reacciones RT-PCR realizadas a las plantas de *Arabidopsis*.

### III. Construcción de plásmidos

Oligonucleótidos	secuencia	Punto de hibridación	cDNA
<b>5BHSOS1</b>	5'ATGACGACTGTAATC3'	+1	<i>AtSOS1</i>
<b>SOSDN_r</b>	5'CAATCGCCGTCCATTATTCATCAGGGATTC3'	+617	<i>AtSOS1</i>

Oligonucleótidos que amplifican una región de 617 pb en el cDNA de *SOS1*. *SOSDN\_r* porta la mutación en la posición 601 (señalada en negrita) que cambia el codón GAT (ácido aspártico) por AAT (asparagina).

<b>SOSDN_f</b>	5'GAATCCCTGATGAATA <b>AAT</b> GGGACGGCGATTG3'	+586	<i>AtSOS1</i>
<b>3BHSOS1</b>	5'ATGCGAAGAAGGCGTAGAACA3'	+1358	<i>AtSOS1</i>

Oligonucleótidos que amplifican una región de 772 pb en el cDNA de *SOS1*. *SOSDN\_f* porta la mutación en la posición 601 (señalada en negrita) que cambia el codón GAT (ácido aspártico) por AAT (asparagina).

<b>attB1-SOS1_f</b>	5'GGGacaagttgtacaaaaaagcaggctac ATGACGACTGTAATCGACGCGACG3'	+1	<i>AtSOS1</i>
<b>attB2-SOS1_r</b>	5'GGGgaccactttgtacaagaaagctgggtc TCATAGATCGTTCCTGAAAACG3'	+3441	<i>AtSOS1</i>

Oligonucleótidos utilizados para unir al cDNA de *SOS1* los sitios attB (señalados en minúsculas) que permiten, mediante recombinación con los sitios attP usando la BP clonasa, su transferencia al vector pDONR™201

### IV. Secuenciación

Oligonucleótidos	Secuencia	Punto de hibridación	cDNA
<b>NHE4P1_f</b>	GTCGACGCCGTTCTCTTCGTC	+100	<i>AtSOS1</i>

Oligonucleótido utilizado en la secuenciación del cDNA de *SOS1*.

<b>SOSDN_f</b>	5'GAATCCCTGATGAATA <b>AAT</b> GGGACGGCGATTG3'	+586	<i>AtSOS1</i>
----------------	-----------------------------------------------	------	---------------

Oligonucleótido utilizado en la secuenciación del cDNA de *SOS1*. Porta la mutación en la posición 601 (señalada en negrita) que cambia el codón GAT (ácido aspártico) por AAT (asparagina).

<b>SOS1+1326_f</b>	5'CACTACCCAATTTGTTCTACGCC3'	+1326	<i>AtSOS1</i>
Oligonucleótido utilizado en la secuenciación del cDNA de <i>SOS1</i> .			
<b>SOS1Xho_f</b>	5'CGGTTACATTGAAAACCTCGAGAA3'	+2065	<i>AtSOS1</i>
Oligonucleótido utilizado en la secuenciación del cDNA de <i>SOS1</i> .			
<b>SOS1A_f</b>	5'GCCAACTGGAGTCTGGCTTATTT3'	+2321	<i>AtSOS1</i>
Oligonucleótido utilizado en la secuenciación del cDNA de <i>SOS1</i> .			
<b>SOS1B_f</b>	5'ATTGGTTTATTATTAGAAGGAT3'	+2713	<i>AtSOS1</i>
Oligonucleótido utilizado en la secuenciación del cDNA de <i>SOS1</i> .			
<b>998BamHI_f</b>	5'TCTATGGATCCCAGCTTCAGAGATCATTT3'	+2992	<i>AtSOS1</i>
Oligonucleótido utilizado en la secuenciación del cDNA de <i>SOS1</i> . Contiene un sitio de restricción <i>BamHI</i> .			
<b>pDONR_f</b>	5'TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC3'	+301	pDONR™201
<b>pDONR_r</b>	5'GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC3'	+2792	pDONR™201
Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de insertos clonados mediante recombinación BP en el vector pDONR™201.			
<b>ER8A_f</b>	5'GCTTGGGCTGCAGGTCGAGGCTAA3'	+3840	pER8-GW
<b>ER8B_r</b>	5'CTGGTGTGTGGGCAATGAACTGATGC3'	+5999	pER8-GW
Oligonucleótidos que hibridan con el vector pER8-GW. Se han utilizado para amplificar por PCR el cDNA clonado en este plásmido y para la secuenciación de sus extremos.			
<b>M13_f</b>	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'	+205	PCR®Blunt
<b>T7_r</b>	5'GTAAAACGACGGCCAG3'	+425	PCR®Blunt
Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de insertos clonados en el vector PCR®Blunt II Topo			
<b>CaMV35S_f</b>	5'CGGATTCCATTGCCAGCTATCTG3'	+5500	pBI321
Oligonucleótido utilizado para la secuenciación de insertos clonados en el vector de expresión en plantas pBI321.			