



Homeostasis iónica en condiciones de estrés salino: identificación funcional de la ruta SOS en tomate



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Zakia El Jakaoui
D.L.: GR. 3109-2009
ISBN: 978-84-692-5107-2



CSIC



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN, CSIC,
GRANADA**
**Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular
de Plantas**

TESIS DOCTORAL

**Homeostasis iónica en condiciones de estrés
salino: identificación funcional de la ruta SOS en
tomate**

ZAKIA EL JAKAOUI

Granada, 2009

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN, CSIC,
GRANADA**

**Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular
de Plantas**

**Homeostasis iónica en condiciones de estrés
salino: identificación funcional de la ruta SOS en
tomate**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada
en Ciencias Biológicas, **Zakia El Jakaoui**, para aspirar
al Grado de Doctor

Fdo. Zakia El Jakaoui

V^oB^o Directores del trabajo

Fdo. Raquel Olías Sánchez
Doctora en Ciencias Biológicas
Investigadora contratada

Fdo. Andrés Belver Cano
Doctor en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC

Granada, 2009

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Granada, en el seno del grupo de investigación Bioquímica y Biología Molecular del Estrés Abiótico en Plantas.

Dedico todo mi trabajo y esfuerzo a mis padres, a mis hermanos, y de forma muy especial, a Karim. A ellos, por todo el cariño y apoyo que siempre supieron darme.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi mas sincera admiración y profundo agradecimiento al Dr. Andrés Belver Cano, ya que ha sido para mí un auténtico privilegio y honor haberlo tenido como director de esta Tesis Doctoral, agradeciéndole la gran oportunidad que me ha dado y la confianza que ha depositado en mí a lo largo del desarrollo de la misma. También quisiera agradecerle sinceramente todo lo que me ha enseñado en estos últimos años, y sobre todo, el tiempo y el esfuerzo que me ha dedicado, y sus continuos consejos en el transcurso de esta Tesis Doctoral. Muchas gracias de todo corazón, Andrés.

Igualmente quisiera agradecer a la doctora Raquel Olías Sánchez, codirectora de esta Tesis, por su intensa labor de colaboración y asesoramiento en el desarrollo de este trabajo.

Quiero expresar mi más profunda gratitud a la Dra. Pilar Rodríguez Rosales, por su generosa implicación y rigor científico, también su atención y sus continuos consejos, que han contribuido a que la nave llegue a buen puerto.

Al Dr. Kees Venema, por su gran calidad humana y con grandes ideas científicas, cuyos comentarios han sido y continúan siendo muy valiosos.

A la Dra M^a del Carmen Marín Manzano, por haberme aconsejado tan sabiamente en el inicio de esta andadura.

Al Dr. F. Meggouh, por la gran ayuda que me prestó en todo momento y sus valiosos consejos en todos los aspectos. Muchas gracias.

A la Dra María Jesús Delgado por haberme facilitado el contacto con el grupo receptor de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC de Granada.

Los Drs. Francisco Javier Quintero y Jose Manuel Pardo, del Instituto de Recursos Naturales del CSIC de Sevilla, por la amable cesión de los plásmidos y cepas utilizadas para la expresión heteróloga en levaduras, así como las semillas mutantes de Arabidopsis usadas en este estudio. Asimismo, sus consejos y sugerencias en relación a este trabajo han sido de gran utilidad, por lo que les quedo profundamente agradecida.

A todos mis profesores del Programa de Doctorado, mi reconocimiento y gratitud por todas las enseñanzas que tan generosamente me han brindado.

A mis compañeros de Departamento, por ayudarme en los momentos de flaqueza y sus ánimos para continuar, Nieves, Francisco, Ana, Isabel, Kifah, Mourad, y Raul. A este último, le agradezco profundamente sus eficientes gestiones y su infinita paciencia.

A mis amigos, fantásticos, Khalid, Fadwa, Nesrine, Andreana y Fatima, por su apoyo incondicional.

A María José, por ser la persona que ha compartido el mayor tiempo a mi lado, porque en su compañía, las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe.

Por último, mi mayor y especial gratitud a mis Padres. A ellos les debo lo que soy. No creo que pueda encontrarse unos padres mejores. Por su cariño, su forma de educarme, sin imposiciones, sin exigirme nada, dándome siempre libertad para que hiciera lo que considerara oportuno, pero a la vez, inculcándome unos valores que son el mayor tesoro que poseo. También a mis hermanos, que han sido un espejo en el que siempre he tratado de mirarme.

A todos y a cada uno, gracias

I. Índice

I. Índice	11
II. Introducción y Objetivos	17
III. Antecedentes Científicos	21
A1. La salinidad como factor ambiental de estrés	23
A.1.1. Descripción del problema	23
A.1.2. Susceptibilidad de las plantas a la salinidad	23
A.1.3. Efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas.....	25
A.2. Tolerancia de las plantas a la salinidad	29
A.2.1. Mantenimiento de la homeostasis iónica	34
A.2.1.1. Transportadores implicados en la homeostasis de Na ⁺ y K ⁺	34
A.2.1.1.1. Entrada de Na ⁺	35
A.2.1.1.2. Transportadores implicados en el eflujo de Na ⁺ : SOS1	39
A.2.1.1.3. Transportadores implicados en compartimentación vacuolar de Na ⁺ : NHX1	40
A.2.1.1.4. Transportadores implicados en el transporte de Na ⁺ larga distancia: SOS1 y HKT	42
A.2.1.2. Ruta SOS: descripción de sus componentes	47
A.2.1.2.1. SOS1	49
A.2.1.2.2. SOS2	55
A.2.1.2.3. SOS3	58
A.2.2. Otros mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis celular	61
A.2.2.1. Producción de osmolitos.....	61
A.2.2.2. Producción de ROS	63
A.3. Idoneidad del tomate como modelo genético vegetal para estudiar la homeostasis iónica bajo condiciones salinas	63
A.4. Aplicación de herramientas de genómica funcional para la caracterización de genes implicados en la homeostasis iónica. Silenciamiento génico postranscripcional.....	67
IV. Plan de Trabajo	73
V. Material y Métodos	77
M.1. Material biológico.....	79
M.1.1. Bacterias	79
M.1.1.1. Cepas bacterianas utilizadas	79
M.1.1.2. Medios y condiciones de crecimiento de bacterias	79
M.1.1.3. Transformación de <i>E.coli</i>	81
M.1.1.4. Transformación de <i>A.tumefaciens</i>	82
M.1.1.4.1. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	82
M.1.1.4.2. Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	82
M.1.2. Levaduras	82
M.1.2.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas	82
M.1.2.2. Medios y condiciones de crecimiento de levaduras	83
M.1.2.3. Transformación de levaduras	85
M.1.3. Material vegetal	85
M.1.3.1. <i>Solanum lycopersicum</i> L.	85
M.1.3.1.1. Esterilización de semillas	86
M.1.3.1.2. Cultivo de plantas de tomate en suelo	86
M.1.3.1.3. Cultivo de plantas de tomate en perlita	87
M.1.3.1.4. Cultivo de plantas de tomate en hidropónico	88
M.1.3.1.5. Cultivo de tomate in vitro.....	89

M.2. Purificación y análisis de ADN plasmídico	89
M.2.1. Plásmidos utilizados	89
M.2.2. Minipreparaciones de ADN plasmídico	90
M.2.3. Cuantificación de ADN plasmídico	90
M.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	91
M.3. Purificación y análisis de ADN de plantas	91
M.3.1. Extracción de ADN genómico	91
M.3.2. Análisis <i>Southern</i> del ADN genómico de tomate	92
M.3.2.1. Electroforesis de ADN y transferencia a membranas de nylon (<i>Southern blot</i>)	92
M.3.2.2. Hibridación del ADN con sondas radiactivas	94
M.3.3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR.....	95
M.3.3.1. Oligonucleótidos cebadores	95
M.3.3.2. Amplificación de ADN mediante PCR con ADN polimerasa termoestable	97
M.3.4. Ligación y subclonado del producto de PCR	99
M.3.5. Restricción de fragmentos de ADN.....	100
M.3.6. Subclonado en vectores de expresión de levaduras y plantas	101
M.3.7. PCR a partir de colonias de bacterias y levaduras.....	101
M.3.8. Secuenciación del ADN y análisis bioinformático.....	102
M.4. Purificación y análisis de ARN.....	103
M.4.1. Extracción de ARN total de plantas	103
M.4.2. Cuantificación de ARN	104
M.4.3. RT-PCR	105
M.4.4. Reacción de RACE-5'-3'	106
M.4.5. Análisis de la expresión génica por hibridación <i>Northern</i>	110
M.4.5.1. Marcaje de las sondas de ADNc con ³² P-dCTP por cebamiento al azar	110
M.4.5.2. Separación del ARN en geles desnaturalizantes de formaldehído	111
M.4.5.3. Transferencia del ARN a filtros de membranas de nylon cargados positivamente (<i>Northern blot</i>).....	111
M.4.5.4. Condiciones de hibridación	112
M.4.5.5. Detección y cuantificación de los niveles de expresión génica.....	112
M.4.6. Análisis de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativa	112
M.5. Complementación funcional del sistema SOS en levaduras (<i>drop-tests</i>)	113
M.5.1. Plásmidos de levadura utilizados	113
M.5.2. Test de complementación (<i>Drop test</i>)	115
M.6. Complementación funcional de mutantes <i>sos</i> de <i>Arabidopsis</i> con los genes <i>SISOS</i>	116
M.6.1. Construcciones génicas para sobreexpresión en <i>Arabidopsis</i>	116
M.6.2. Cultivo de <i>Arabidopsis</i>	117
M.6.2.1. Esterilización de semillas y germinación	118
M.6.2.2. Cultivo en maceta	118
M.6.3. Transformación de <i>Arabidopsis</i> por <i>A. tumefaciens</i>	119
M.6.4. Selección de transformantes	120
M.6.5. Test de segregación y obtención de líneas homocigotas	120
M.7. Genética reversa en tomate mediante silenciamiento génico de <i>SISOS1</i> (RNAi)	121
M.7.1. Construcciones génicas <i>ihpRNA</i>	121
M.7.2. Transformación de cotiledones de tomate.....	123
M.7.3. Regeneración de plantas a partir de los cotiledones transformados	124

M.7.4. Selección de transformantes y propagación	125
M.7.5. Detección de las líneas transformantes por PCR.....	125
M.7.6. Análisis de la expresión génica en las líneas silenciadas	126
M.7.7. Evaluación del fenotipo de los transformantes con supresión de <i>SISOS1</i>	126
M.7.8. Purificación de vesículas de membrana plasmática	128
M.7.9. Medida de la actividad antiportadora Na ⁺ /H ⁺	129
VI. Resultados.....	131
R.1. Aislamiento de los ORFs que codifican a los genes <i>SISOS</i>	133
R.1.1. <i>SISOS1</i>	133
R.1.1.1. Aislamiento y clonaje.....	133
R.1.1.2. Análisis de la secuencia de <i>SISOS1</i>	135
R.1.2. <i>SISOS2</i>	139
R.1.2.1. Aislamiento y clonaje.....	139
R.1.2.2. Análisis de la secuencia de <i>SISOS2</i>	142
R.1.3. <i>SISOS3</i>	143
R.1.3.1. Aislamiento y clonaje.....	143
R.1.3.2. Análisis de la secuencia de <i>SISOS3</i>	144
R.2 Caracterización funcional de <i>SISOS</i> en levadura.....	146
R.3. Complementación funcional de mutantes <i>sos</i> de <i>Arabidopsis</i> con los genes <i>SISOS</i>	151
R.3.1. Complementación funcional de mutantes de <i>Arabidopsis sos2-2</i> con <i>SISOS2</i>	151
R.3.2. Complementación funcional de mutantes de <i>Arabidopsis sos3</i> con <i>SISOS3</i> ..	155
R.4. Patrón de la expresión de <i>SISOS1</i> en función de la especie del tomate.....	158
R.5. Silenciamiento de <i>SISOS1</i> en tomate	161
R.4.1. Análisis del crecimiento de las plantas silenciadas en <i>SISOS1</i> en condiciones de estrés salino.	166
R.4.2. Determinación de la actividad antiportadora Na ⁺ /H ⁺ en vesículas de membrana plasmática.....	167
R.4.3 Análisis del contenido de Na ⁺ y K ⁺ en plantas cultivadas en condiciones de estrés salino.	170
VII. Discusión	181
D.1. <i>SISOS1</i>	184
D.2. <i>SISOS2</i> y <i>SISOS3</i>.....	191
VIII. Conclusiones.....	195
IX. Bibliografía.....	199
X. Apéndice.....	223
XI. Abreviaturas.....	227

II. Introducción y Objetivos

La homeostasis iónica es un aspecto clave en la tolerancia al estrés salino ya que constituye un mecanismo global que conlleva el mantenimiento en el citosol de una alta razón K^+/Na^+ , resultado de la exclusión de iones Na^+ (y Cl^-) a través del plasmalema y su compartimentación en la vacuola, así como la regulación de los procesos de transporte implicados en la reabsorción de Na^+ por el xilema y floema de la planta (transporte de Na^+ a larga distancia). Además, estos procesos regulan indirectamente la homeostasis de K^+ bajo condiciones salinas, en una gran medida, debido a la participación de diferentes transportadores de Na^+ . A nivel molecular, el control de dicho proceso tiene lugar por la acción concertada de transportadores primarios y secundarios ubicados en dichas membranas que están bajo el control de un mecanismo de transducción de la señal de estrés que coordina dicha respuesta a nivel de célula, tejido y organismo.

En *Arabidopsis*, se ha descrito una nueva ruta reguladora dependiente de Ca^{2+} gobernada por los genes *SOS* que controla la homeostasia del Na^+ y K^+ intracelular y el transporte de Na^+ a larga distancia, y que determina la tolerancia de esta planta a la salinidad. Sin embargo, la relevancia que esta ruta tendría en la tolerancia a la salinidad en las especies hortícolas es prácticamente desconocida porque no se han estudiado los genes *SOS* ortólogos. Por otro lado, el estudio de procesos tan importantes como la reabsorción de sales por las células del tallo, que afecta fuertemente al transporte de Na^+ a larga distancia y su distribución diferencial en las hojas más viejas, resulta prácticamente inabordable en *Arabidopsis* por la extrema cortedad de su tallo. Es por esto, por lo que el tomate constituye un modelo vegetal más adecuado para esta investigación, no sólo por cumplir dichos requisitos sino también por su gran diversidad genotípica en relación a la tolerancia a la salinidad y por su fácil transformación, así como por la disponibilidad de gran cantidad de información de los proyectos de secuenciación de ESTs a gran escala que pueden ayudar a la identificación funcional de genes de interés.

Como objetivo general del presente trabajo se propone la identificación de los ortólogos de estos genes en tomate (*SISOS*) y su caracterización funcional en sistemas heterólogos como levaduras y *Arabidopsis*. Asimismo, se pretende la caracterización funcional *in planta* del antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática, *SISOS1*, mediante la supresión de su expresión. Este estudio contribuirá al conocimiento de las bases moleculares de la tolerancia a la salinidad de Solanáceas, y a su mejora genética, ya que

permitirá identificar factores de halotolerancia que pueden ser transferibles o seleccionables en plantas cultivadas.

III. Antecedentes Científicos

A1. La salinidad como factor ambiental de estrés

A.1.1. Descripción del problema

La salinidad del suelo es uno de los factores ambientales que incide más negativamente en la productividad agrícola y limita el uso potencial de nuevas áreas de cultivo (Munns 2005, Munns y Tester 2008). El 40 % de la superficie mundial corresponde a regiones áridas y semiáridas caracterizadas por ser suelos secos debido a la escasez de lluvias, temperaturas extremas y una alta velocidad de evaporación, donde la producción agrícola depende fuertemente de la irrigación. En estas condiciones, el efecto acumulativo del uso continuado de aguas que contienen sales disueltas, unido a una gran velocidad de evaporación y la baja capacidad de lixiviación de algunos suelos, así como el uso de elevadas cantidades de fertilizantes en ciertas áreas de cultivo y de la penetración del agua del mar en zonas costeras y marismas, ocasionan el fenómeno de salinización de los suelos (Munns 2005). Además, la demanda de agua de alta calidad, debido tanto al incremento de la población humana como el desarrollo industrial, conlleva el uso cada vez más frecuente de aguas de baja calidad en la agricultura, de forma que la sobreexplotación de acuíferos está produciendo la salinización del suelo, por intrusión de agua de mar, lo que agrava el problema tanto desde el punto de vista ecológico como económico.

Se calcula que un 40 % del área mundial dedicada a regadío, está afectada por la salinidad, especialmente aquellas más productivas, como California, el sur de Asia y gran parte del área mediterránea. Dentro de esta última, algunas de las zonas más afectadas son las marismas del Sur, Almería, Murcia, Alicante y Valle del Ebro, así como toda la franja atlántica de la costa marroquí (FAO 2008). Por todas estas razones, la salinidad de suelos y aguas constituye una verdadera amenaza para la agricultura, puesto que la mayoría de las plantas cultivadas, entre ellas el tomate, se ven afectadas en mayor o menor medida por este factor ambiental.

A.1.2. Susceptibilidad de las plantas a la salinidad

La salinidad de los suelos está mayoritariamente determinada por el NaCl, aunque también puede haber cantidades considerables de otras sales como Na₂SO₄, CaSO₄, MgCl₂ y Na₂CO₃ (Zhu 2002). La toxicidad de cada ión varía según la planta: el Cl⁻ es el componente tóxico para cítricos y soja mientras que el Na⁺ resulta más tóxico para la

mayoría de las plantas cultivadas (Munns y Tester 2008 y sus referencias). El crecimiento de las plantas se afecta negativamente cuando la concentración de sales alcanza un valor umbral, a partir del cual, dicho efecto puede variar dentro de un amplio rango, en función de la capacidad genética de las especies, estadio de desarrollo, interacciones ambientales y tipo de ión (Foolad 2007). En función de las concentraciones umbrales que son capaces de soportar sin sufrir daños aparentes, después de 1 a 6 meses de cultivo en condiciones salinas, las plantas se han clasificado en diferentes grupos (**Tabla A1, Greenway y Munns 1980**). El tomate cultivado pertenece a un grupo de sensibilidad intermedia, aunque puede haber una variación interespecífica e intraespecífica con la existencia de especies y de variedades cultivadas que presentan una tolerancia diferencial a la salinidad, abarcando un amplio rango de sensibilidad al estrés por este factor, y en las que la altura del tallo y el crecimiento de la hoja fueron los parámetros de crecimiento más afectados (Cuartero *et al.* 1992, Perez-Alfocea *et al.* 1993, Cuartero y Fernandez-Muñoz 1999, Cuartero *et al.* 2006).

Tabla A1. Clasificación de las plantas según su capacidad de soportar altas concentraciones de NaCl sin daño aparente (Greenway y Munns 1980).

Grupos	Umbral de daño	Especies
Grupo I. Halófitas		
I _A .	400 mM NaCl	<i>Suaeda maritima</i> , <i>Atriplex nummularia</i>
I _B .	>200 mM NaCl	<i>Atriplex hastata</i> , <i>Spartina towsendii</i>
Grupo II. Halófitas y Glicófitas Tolerantes		
II _A . Halófitas monocotiledóneas	200 mM NaCl	<i>Festuca rubra</i> , <i>Puccinella peisonis</i> , <i>Gossypium</i> , <i>Hordeum</i>
II _B . Glicófitas		
Intermedias	>100 mM NaCl	<i>Solanum</i>
Sensibles	<100 mM NaCl	<i>Phaseolus</i> , <i>Glycine</i>
Grupo III. Glicófitas Muy sensibles	<50 mM NaCl	<i>Cítricos</i> , <i>Aguacates</i> , <i>Frutales de hueso</i>

A.1.3. Efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas

El efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se debe a la combinación de los siguientes efectos (Greenway y Munns 1980, Hasegawa et al. 2000, Zhu 2002): a) el estrés hídrico causado por el potencial hídrico más negativo del medio que rodea a la raíz (estrés hiperosmótico), que provoca una pérdida del turgor; b) la toxicidad iónica específica asociada normalmente a la excesiva absorción de iones Na^+ y Cl^- ; c) la perturbación de la nutrición mineral causada por el exceso de Na^+ o Cl^- , que conduce a una menor absorción o a una alteración de la distribución de iones esenciales como el K^+ , Ca^{2+} , nitrato o fosfato; d) el estrés oxidativo secundario debido a la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS).

Estos efectos negativos dan lugar, en plantas más o menos sensibles, a una amplia variedad de respuestas tales como la reducción del turgor, inhibición de las funciones de membrana, determinadas actividades enzimáticas, producción de radicales libres, disminución de la fotosíntesis, inducción de deficiencias iónicas o la interferencia del Cl^- con los sitios aniónicos implicados en el ligamiento de ARN y de metabolitos aniónicos como bicarbonatos, carboxilatos y azúcares fosfatos. De otro lado, el Na^+ puede interferir con los sitios catiónicos implicados en el ligamiento de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . La consecuencia general de todos estos efectos es la reducción del crecimiento, que en caso de extrema severidad del estrés, puede llevar a la muerte de la planta. Diferentes autores han recopilado esta multitud de manifestaciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares en plantas cultivadas bajo condiciones salinas (Greenway y Munns 1980, Shannon et al. 1994, Serrano y Gaxiola 1994, Serrano 1996, Serrano et al. 1999, Hasegawa et al. 2000, Zhu 2002, Munns 2002, y 2005, Botella et al. 2005, Shabala y Cuin 2007, Yeo 2007, Munns y Tester 2008, Tuteja 2008).

A diferencia de las plantas halófitas, las glicófitas reducen rápidamente su crecimiento bajo condiciones salinas, afectándose más la parte aérea que la raíz (Greenway y Munns 1980). En tomate (Snapp y Shannan 1992), maíz (Cramer et al. 1988) y algodón (Cramer y col. 1985), se ha observado que el crecimiento de la raíz puede resultar igualmente afectado que la parte aérea. Actualmente, se acepta que el efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento sigue un modelo bifásico (**Fig. A1**, Munns 1993, 2002, y 2005, Munns y Tester 2008), consistente en la inhibición en una fase muy temprana, por una reducción del suministro de agua debido a un efecto osmótico inespecífico de las sales, que

se continúa en una fase más tardía (días, semanas, dependiendo de la especie), por un efecto iónico específico, a causa de la alta concentración intracelular de iones Na^+ y Cl^- , que provoca daños a nivel celular y acelera la senescencia de las hojas. Aquí, la velocidad de muerte de la hoja es crucial para la supervivencia de la planta, ya que si la velocidad de producción de nuevas hojas es mayor que las que mueren habrá suficiente capacidad de fotosíntesis como para mantener el crecimiento y desarrollo de la planta hasta la producción de flores y frutos, aunque a un número reducido. Si dicha velocidad es menor, la planta no sobrevivirá para producir semillas (Munns 2005).

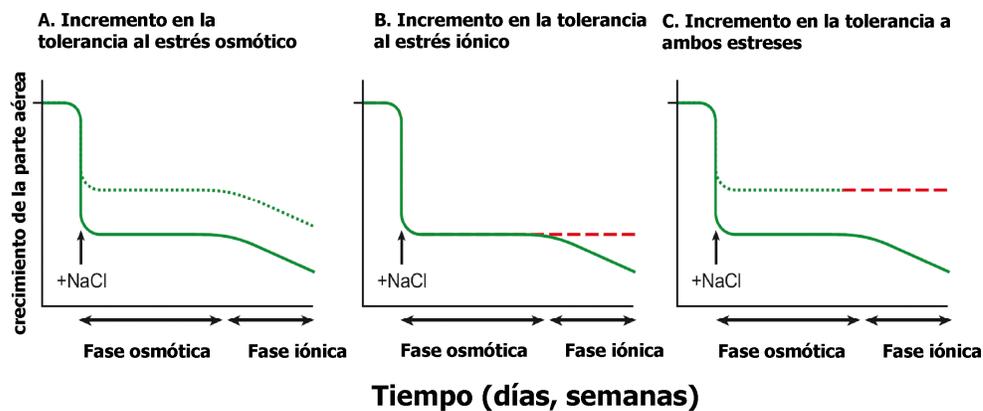


Figura A1. Respuesta en dos fases del crecimiento de las plantas al estrés salino. Una respuesta rápida al incremento en la presión osmótica (fase osmótica), y una respuesta más lenta debido a la acumulación de Na^+ en las hojas (fase iónica). La línea sólida verde representa el cambio en la velocidad de crecimiento después de la adición de NaCl . **A.** La línea discontinua verde representa la respuesta hipotética de una planta con un incremento de la tolerancia al componente osmótico del estrés salino. **B.** La línea discontinua roja representa la respuesta de una planta con un incremento de la tolerancia al componente iónico del estrés salino. **C.** La línea verde y roja representa la respuesta de una planta con un incremento de la tolerancia a ambos componentes del estrés salino. Tomado de Munns y Tester (2008).

Ha existido siempre una gran controversia acerca de la causa primaria responsable de la disminución del crecimiento de plantas glicófitas por la salinidad en esta primera fase osmótica. Algunos autores han sugerido que este efecto rápido tiene lugar primariamente en la raíz (Neumann et al. 1988, Munns 1993, Ortiz et al. 1994). El crecimiento de la parte aérea estaría regulado por el estatus hídrico de la raíz, mediado por señales químicas, como el ácido abscísico y citoquininas inducidas por el efecto osmótico del estrés salino (Davies y Zhang 1991), aunque también se ha postulado que dichas señales son de naturaleza

hidráulica (Kramer 1988). En contraste con el concepto de la raíz como sensor primario del estrés salino, otros autores habían mostrado en maíz una inhibición de la elongación de las hojas, independientemente de la raíz (Cramer y Bowman 1991). Dicho efecto inhibitorio sobre la parte aérea, estaría localizado en los tejidos en crecimiento y no en las hojas maduras, merced a una disminución del turgor, derivado del déficit hídrico causado por el componente osmótico del estrés (Thiel y col. 1988, Cramer y Bowman 1991). Alternativamente, se ha propuesto como causa primaria una alteración en la nutrición de las células del meristemo apical de la parte aérea (Lazof y Läubli 1991).

Algunos autores han indicado que la salinidad podría afectar el crecimiento de las plantas al disminuir la cantidad de fotosintatos que llegan a la zona de crecimiento, vía reducción de la fotosíntesis por unidad de área de hoja, o de su transporte por el floema (Greenway y Munns 1980). Sin embargo, se ha demostrado que la inhibición del crecimiento bajo condiciones salinas era mucho mayor que la inducida sobre la capacidad fotosintética por unidad de área de hoja, lo que indicaba que la acción sobre la fotosíntesis no era la causa primaria (Cheeseman 1988).

Muy recientemente se ha descrito en tomate, que la fase osmótica del estrés salino promueve la senescencia de la hoja previo a la masiva acumulación tóxica de Na^+ debido a cambios hormonales, como la acumulación de ABA, disminución de IAA, y una fuerte reducción de citoquininas, siendo el precursor de etileno, ACC, la señal mas importante que se correlaciona con el momento del daño oxidativo, que precede a dicha acumulación masiva de Na^+ (Ghanem et al 2008, Albacete et al 2009).

Otro de los efectos primarios del estrés salino sobre el crecimiento se había atribuido a un daño en las membranas celulares ejercido por el componente iónico del estrés, como resultado de una alteración de la estructura y funcionalidad de las mismas, a través de cambios inducidos en sus componentes lipídicos y/o protéicos (Brown y Dupont 1989, Belver y Travis 1990, Hurkman 1992, Rodriguez Rosales et al. 1999). Este daño en las membranas explicaría la alteración en procesos tales como fotosíntesis, respiración y absorción y transporte de nutrientes minerales (Läubli y Epstein 1990). Se había postulado que una acción tóxica rápida del estrés salino sobre las membranas podría provenir del desplazamiento por el Na^+ de los iones Ca^{2+} asociados a la membrana plasmática y otros sistemas endomembranarios (Lynch y Läubli 1988, Lynch et al. 1989). Ello tendría como consecuencia una alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y constituiría la respuesta primaria de las células de las raíces al estrés salino, lo que explicaría la gama de alteraciones observadas en respuesta a la sal

(Läuchli y Epstein 1990, Rengel 1992). Asimismo, este efecto explicaría la protección del Ca^{2+} de los efectos adversos de la salinidad sobre las plantas (Läuchli y Epstein 1990).

Actualmente, el papel relevante del Ca^{2+} en la tolerancia a la salinidad es explicable por su acción inhibitoria sobre los canales de cationes no selectivos (NSCC) que previene la entrada de Na^+ en la planta (Demidchik y Tester 2002, Tester y Davenport 2003), sobre el eflujo de K^+ inducido por Na^+ , a través de los canales conocidos como KORC (*K⁺ outward-rectifying channel*), que previene la pérdida de K^+ (Shabala et al. 2006), así como en el contexto de su función como segundo mensajero celular. A este respecto, la evidencia acumulada indica que el estrés salino es percibido por la planta por un sensor de naturaleza desconocida, que dispara el incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, activando una cascada de reacciones de fosforilación/desfosforilación que implicaría a diferentes proteínas quinasas y fosfatasas dependiente de este ión. Esta respuesta, a su vez, regularía una batería de proteínas implicadas en la tolerancia a la sal de manera que una persistencia del estrés que llegara a superar los mecanismos homeostáticos de defensa, ocasionaría todos los efectos negativos asociados a la salinidad (Vinocur y Altman 2005, Mahajan et al. 2008, **Fig. A2**). Algunos de estos aspectos serán tratados en el **apartado 2.1.2**. en el contexto de la regulación de la homeostasis de Na^+ y K^+ por la ruta SOS.

Cualquiera que sea la causa primaria implicada en este estrés abiótico, la disminución del crecimiento en condiciones salinas parece tener connotaciones adaptativas, puesto que parte de la energía usada normalmente en el crecimiento y desarrollo, se desvía hacia procesos de mantenimiento de los mecanismos involucrados en la tolerancia al estrés, tales como la regulación de las concentraciones intracelulares de iones, síntesis de solutos orgánicos compatibles y el mantenimiento de la integridad de las membranas (Hasegawa et al. 2000, Yeo 2007).

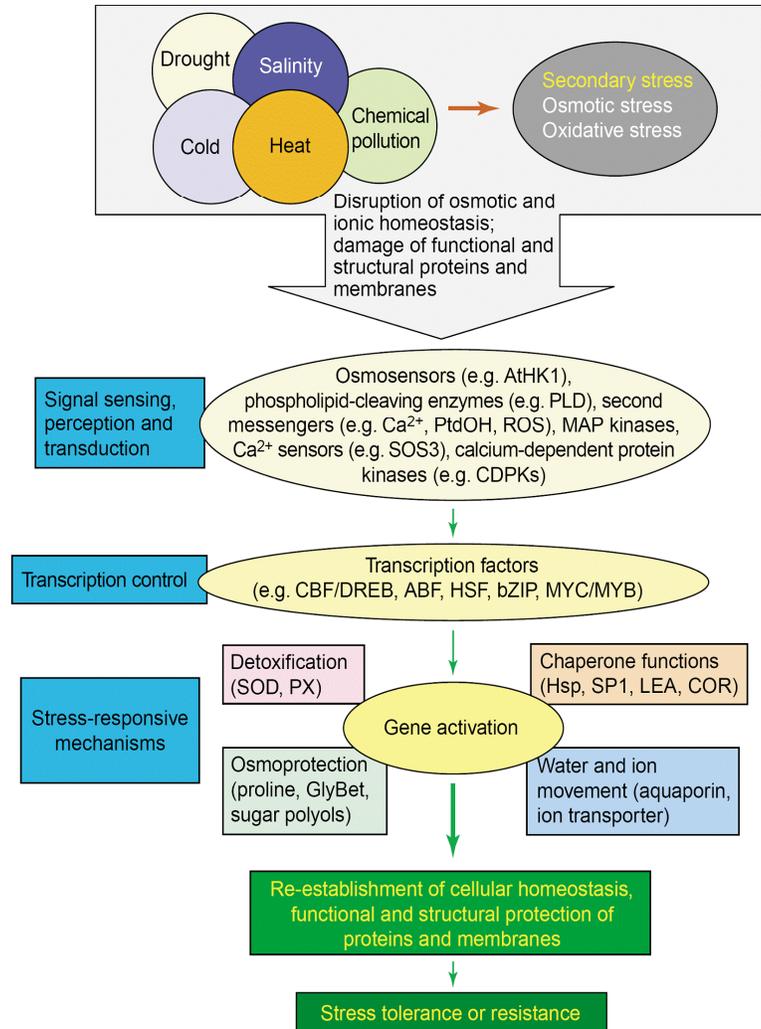


Figura A2. Complejidad de la respuesta de las plantas a estreses abióticos, mostrando la ruta genérica de la transducción de la señal de estrés. El estrés salino primario como otros estreses abióticos induce un estrés osmótico y oxidativo. Dichas señales de estrés son detectados por sistemas sensores o de percepción que conducen internamente a través de las cascadas de traducción, a la activación génica y/o metabólica de las proteínas efectoras encargadas de la respuesta al estrés y conlleva en una planta tolerante al restablecimiento de la homeostasis celular. Tomado de Vinocur y Altman (2005).

A.2. Tolerancia de las plantas a la salinidad

Las plantas pueden adoptar dos tipos de respuestas adaptativas frente a la salinidad. Por un lado, las que se engloban en un mecanismo de evitación, mediante el desarrollo de funciones y estructuras celulares que protegen de dichas condiciones. Por otro lado, un mecanismo de tolerancia mediante el cual las células adaptan sus funciones para que puedan operar con altas concentraciones intracelulares de sales. Con frecuencia, en las

plantas se dan simultáneamente estos dos tipos de respuesta (Greenway y Munns 1980). De hecho, ambas denominaciones suelen confundirse bajo el nombre genérico de mecanismos de tolerancia y, a lo largo de este trabajo, se seguirán utilizando sin distinción. La homeostasis iónica a nivel de planta completa requiere una coordinación precisa entre los mecanismos celulares y los que operan a nivel intercelular, en tejidos y órganos. A nivel celular, los mecanismos de tolerancia a la salinidad descansan sobre varios aspectos interrelacionados, ya referidos anteriormente (Shannon et al. 1994, Serrano 1996, Tester y Davenport 2003, Vinocur y Altman 2005, Munns 2005, **Fig. A3**):

a) el mantenimiento del equilibrio osmótico en relación con el tonoplasto y con el medio externo, requiere la síntesis en el citoplasma de solutos orgánicos compatibles (prolina, sacarosa, azúcares, etc.);

b) el mantenimiento de la homeostasis iónica, es decir, el control de la absorción de iones a nivel del plasmalema y su compartimentación intracelular (vacuolas), de manera que se mantengan las concentraciones de iones en el citoplasma dentro de un rango de 100 a 200 mM de K^+ , 1 a 30 mM Na^+ y Cl^- y 100 a 200 nM Ca^{2+} , requiriéndose una alta selectividad para el K^+ sobre el Na^+ , del Mg^{2+} sobre el Ca^{2+} , y del fosfato sobre el cloro o el nitrato;

c) la capacidad de reparación del daño, de secuestrar ROS y de proteger estructuras celulares sensibles mediante el incremento de la síntesis de proteínas con función antioxidante y chaperona (**Fig. A2**);

d) y un apropiado y coordinado sistema de transducción de la señal de estrés, en la que una serie de moléculas (segundos mensajeros) deben regular bien, vía metabólica, a las proteínas efectoras implicadas en el transporte iónico, mantenimiento del turgor, o la detoxificación de ROS, o bien a través de la expresión de los genes que las codifican (**Fig. A2**, Chinnusamy et al. 2005, Vinocur y Altman 2005).

A nivel de organismo, las plantas han desarrollado un amplio rango de cambios anatómicos y fisiológicos para el control del transporte de iones y agua y su distribución a nivel de tejidos y del organismo entero. De acuerdo con el modelo conceptual de transporte de agua y solutos a nivel de raíz (De Boer y Volkov 2003, **Fig. A4**), la absorción de iones y agua en este órgano tiene lugar primariamente en el plasmalema de las células epidérmicas y corticales de la raíz. Posteriormente, son transportados, vía simplasto, a través de los plasmodesmos de células adyacentes, hasta las células de la estela, siendo finalmente, liberados a los vasos del xilema, vía apoplasto, a través del plasmalema de las células de la estela o, directamente, desde las células parenquimáticas del xilema. La ruta

apoplástica, otra vía de entrada de agua e iones, está formada por el entramado de las paredes celulares de las células de la raíz. Esta ruta, de difusión pasiva, y por tanto, no selectiva, puede interrumpirse, a partir de la zona de diferenciación de la raíz, por la presencia de zonas suberinizadas en las paredes de las células de la endodermis (banda de Caspary), restringiendo el paso de iones y agua, forzando la entrada al simplasto de la estela a través del plasmalema de estas células.

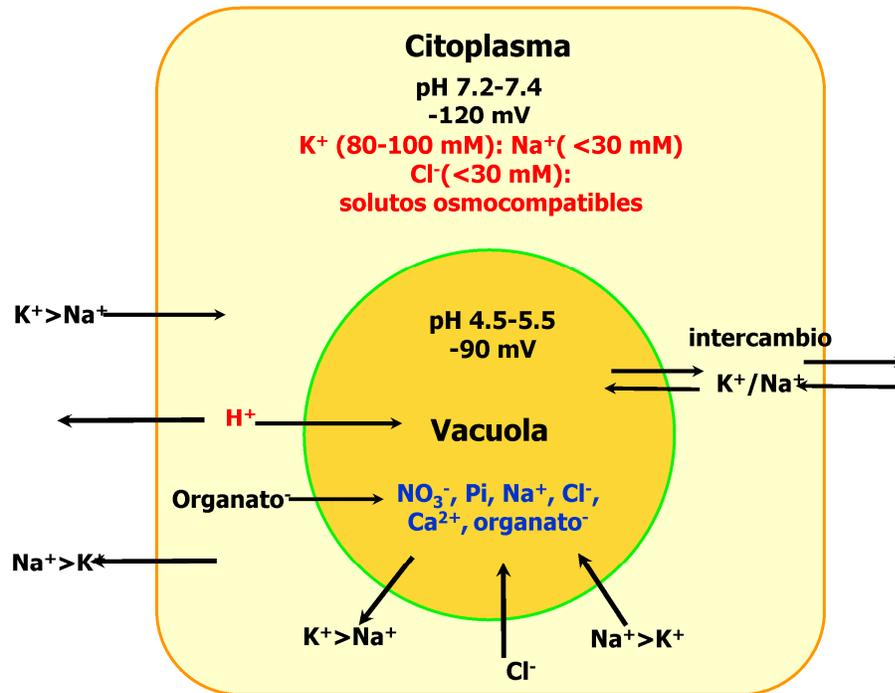


Figura A3. Mecanismos de tolerancia de las plantas a la salinidad a nivel celular, mostrando la compartimentación intracelular de iones y solutos y ajuste osmótico.

En el contexto de la planta entera, la toxicidad del Na^+ se ha asociado con su grado de acumulación en la parte aérea (hojas) en plantas glicófitas, por lo que han desarrollado una estrategia de exclusión de iones a nivel de la raíz (Tester y Davenport 2003, Yeo 2007). La capacidad de exclusión de Na^+ viene dada por el control del flujo neto de absorción de Na^+ , que resulta del balance entre el flujo unidireccional de entrada y el eflujo de salida al medio, así como del control de su translocación a la parte aérea, resultado de su deposición en las vacuolas de las raíces o en las células proximales del tallo evitando su acumulación en las hojas (Apse y Blumwald 2007).

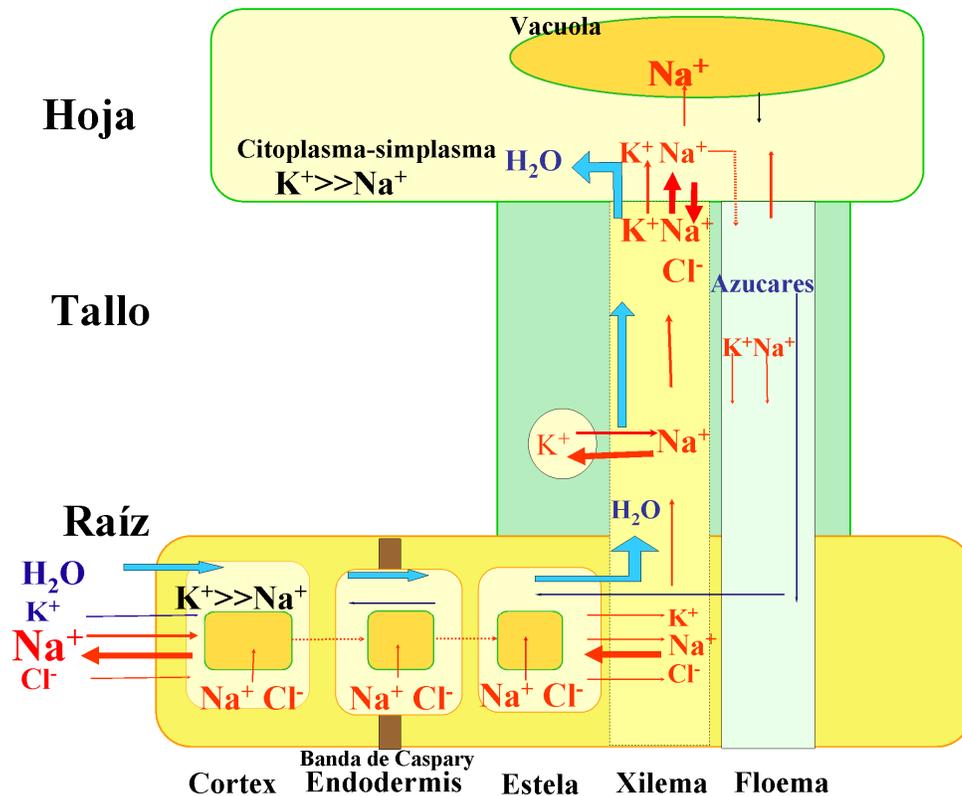


Figura A4. Esquema general de transporte de agua e iones a nivel de la planta entera mostrando las diferentes rutas de control de la selectividad del K^+ en relación al Na^+ .

Una segunda estrategia, propia de plantas glicófitas tolerantes y halófitas descansa en la tolerancia de los tejidos vegetales al Na^+ , esencialmente de las hojas, y está basada en una adecuada regulación de la velocidad de absorción de los iones por la raíz y su translocación a la parte aérea, donde la compartimentación subcelular evita la toxicidad iónica, al tiempo que contribuye significativamente al ajuste osmótico, lo que requiere que la capacidad de compartimentar el Na^+ en las vacuolas de tallos y hojas vaya asociada a un crecimiento sostenido de las mismas (Apse y Blumwald 2007, Munns y Tester 2008).

A nivel radicular, los mecanismos que controlan la absorción selectiva de iones y su compartimentación intracelular gobiernan la tolerancia relativa a la salinidad (Cheeseman 1988, Niu et al. 1995, Tester y Davenport 2003). La absorción por las raíces de grandes cantidades de iones Na^+ y Cl^- provoca la alteración de la absorción y, por tanto, del contenido de otros iones, particularmente K^+ y Ca^{2+} (Tester y Davenport 2003 y sus referencias), resultando de especial importancia en la tolerancia a la sal, el mantenimiento de la selectividad entre el K^+ y el Na^+ en el citoplasma (Greenway y Munns 1980, Shannon

et al. 1994, Mathuis y Atmann 1999). El control de la selectividad K^+/Na^+ parece establecerse a nivel del plasmalema y del tonoplasto de las células epidérmicas y corticales de la raíz, que son las que controlan la absorción selectiva de iones y su compartimentación celular (**Fig. A4, Tabla 2**, Munns 2002).

Otro punto de control de la selectividad K^+/Na^+ se establece a nivel del plasmalema de las células parenquimáticas del xilema, responsable de la carga activa de iones en el xilema, y por tanto, de la concentración relativa de iones que llega a la parte aérea por la corriente xilemática (Munns 2002). En muchas especies glicófitas, con altas razones K^+/Na^+ en partes aéreas, la liberación preferente de K^+ en el xilema o la reabsorción de Na^+ de la savia xilemática, conduce a una mejora en la selectividad K^+/Na^+ . Concretamente, en legumbres, existe un mecanismo de exclusión de Na^+ de la parte aérea basado en el intercambio Na^+/K^+ en las células parenquimáticas del xilema, con apariencia de células de transferencia, a nivel de las partes proximales del tallo y de la raíz (**Fig. A4**, Läuchli y Epstein 1990). Este mecanismo de exclusión de Na^+ de las hojas confiere tolerancia a una salinidad de intensidad y duración moderada, ya que las capacidades de almacenamiento de estas células son rápidamente saturadas (Läuchli y Epstein 1990).

A nivel foliar, los mecanismos de respuesta al estrés salino son también complejos y, probablemente, presentan una mayor variación entre especies. De igual forma que en la raíz, los mecanismos de transporte a través del plasmalema y tonoplasto de las células de la hoja son los responsables últimos de la distribución de solutos a nivel intracelular y de tejido (Niu et al. 1995). Para evitar la acumulación excesiva de sales en tejidos fotosintéticos, algunas plantas acumulan diferencialmente el NaCl en determinadas zonas de la hoja, o en hojas maduras o lo recirculan en dirección a las raíces (Jeschke 1984, Tester y Davenport 2003). En plantas halófitas pueden encontrarse adaptaciones anatómicas especiales que evitan dicha acumulación. Por ejemplo, en *Suaeda maritima* se produce un fenómeno de succulencia, que no es más que un mecanismo de dilución de sales, en función de un aumento en la razón vacuola/citoplasma, tamaño celular y de una alta velocidad de crecimiento (Munns 1993). Un mecanismo alternativo que se da en este tipo de plantas, es la formación de estructuras acumuladoras de sales en superficies epidérmicas de hojas y tallos, que excretan al exterior a través de la cutícula, por medio de glándulas de sal o, que la acumulan en células "ampollas" que rompen al exterior una vez saturadas (Jeschke 1984).

A.2.1. Mantenimiento de la homeostasis iónica.

A.2.1.1. Transportadores implicados en la homeostasis de Na⁺ y K⁺

Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto clave de la toxicidad por Na⁺ es su competición por los sistemas de absorción de K⁺, lo que resulta en una deficiencia nutricional de K⁺ y una perturbación del potencial osmótico de la célula, tanto por la elevada concentración de Na⁺ externa, como por la disminución de la concentración del K⁺ en el interior de la célula (Zhu et al. 1998, Shabala y Cuin 2007, **Fig. A5**). Teniendo en cuenta que el K⁺ participa como cofactor en procesos metabólicos clave en el citosol, como cofactor en numerosas reacciones enzimáticas (cerca de 50 enzimas citosólicas), y está implicado en la síntesis de proteínas (Marschner 1995), el alcance de la perturbación del metabolismo de la hoja y de la raíz puede ser bastante severa (Shabala y Cuin 2007). De ahí que el mantenimiento de una alta concentración de K⁺ en las células sea fundamental para evitar los efectos negativos del Na⁺ y del estrés hídrico asociado (Mathuis y Atmann 1999). Por tanto, la homeostasis de Na⁺ y K⁺ es un mecanismo clave en la tolerancia al estrés salino y constituye un proceso global complejo y coordinado, que conlleva el mantenimiento en el citoplasma de una alta razón K⁺/Na⁺ (Tester y Davenport 2003, Apse y Blumwald, 2007). A menudo, dicho concepto se confunde con la razón K⁺/Na⁺ del tejido (parte aérea u hoja), lo cual resulta erróneo, puesto que es la homeostasis citosólica de K⁺ y no la del contenido vacuolar, la que resulta esencial en los procesos metabólicos, si bien aquella última tiene algún impacto en el ajuste osmótico (Mathuis y Atmann 1999, Shabala y Cuin 2007, y sus referencias).

A este respecto, las evidencias recientes obtenidas en plantas modelo como *Arabidopsis* y arroz, ha conducido a la idea actualmente preponderante de que la homeostasis del K⁺ a nivel de planta entera bajo condiciones salinas tiene lugar, al menos en una gran medida, por medio de la regulación de las concentraciones internas de Na⁺ en los diferentes tejidos, a través de diferentes transportadores de Na⁺ que controlan la selectividad de K⁺ sobre la de Na⁺, mediante la extrusión de Na⁺ al medio externo, su compartimentación vacuolar, así como la carga y descarga xilemática (Zhu et al 1998, Tester y Davenport 2003, Horie y Schroeder 2004, Rus et al. 2005; Ren et al. 2005, Sunarpi et al. 2005, Apse y Blumwald 2007, **Figs. A5 y A6**). En otra medida, también puede depender de la prevención de la pérdida de K⁺ fuera de la célula (Shabala y Cuin 2007). En todos estos procesos que previenen la acumulación excesiva

de Na^+ en el citosol o la pérdida de K^+ (alta razón K^+/Na^+), parecen ser claves una serie de transportadores de Na^+ y K^+ sumariados en la **Tabla 2**, y que serán revisados en este apartado, con especial hincapié en el control de la homeostasis de estos iones llevado a cabo por SOS1 (ruta SOS), como objetivo fundamental este trabajo.

Tabla A2. *Mecanismos que previenen la acumulación excesiva de Na^+ o previenen la pérdida de K^+ (alta razón K^+/Na^+) en el citosol y transportadores probablemente implicados (Em, Potencial de membrana):*

Toma selectiva de iones: ($\text{K}^+ \gg \text{Na}^+$) NSCC, KORC, (Em, P- H^+ -ATPasa).
Extrusión de Na^+ al medio o al apoplasto: Antiportadores Na^+/H^+ , SOS1. (Em, P- H^+ -ATPasa).
Compartimentación vacuolar: Antiportadores Na^+/H^+ (NHX). (Em, V- H^+ -ATPasa, V- H^+ -PPasa).
Control de la carga xilemática (y floemática ?): HKT1 y SOS1

A.2.1.1.1. Entrada de Na^+

En condiciones normales, las plantas mantienen en el citosol una concentración relativamente alta de potasio (100-200 mM) y una concentración relativa baja de sodio (1-10 mM) (Tester y Davenport 2003). Debido al potencial eléctrico de la membrana (-140 mV), un aumento en la concentración extracelular de sodio favorecerá su transporte pasivo hacia el citosol debido al gran gradiente de potencial electroquímico que se establece. La absorción de Na^+ tiene lugar a nivel de las células epidérmicas y corticales de la raíz. Se han propuesto tres rutas para la absorción del Na^+ por la planta (Tester y Davenport, 2003). Dos de ellas de tipo simplástico, están mediadas por transportadores y se pueden distinguir por su relativa sensibilidad al calcio extracelular. La tercera vía, denominada flujo de desvío, se atribuye a la filtración a través del apoplasto debida a la discontinuidad en la endodermis.

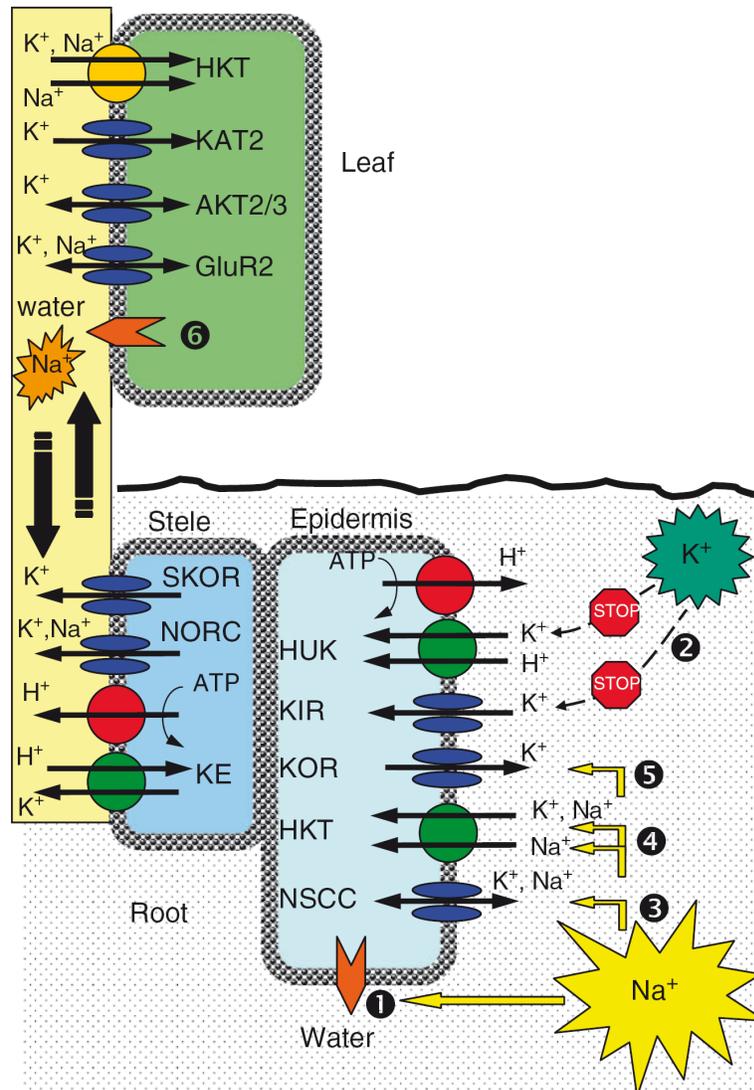


Figura A5. Efectos adversos de la salinidad sobre la homeostasis de K^+ y relaciones iónicas en plantas. Niveles elevados de Na^+ en la solución del suelo induce la salida de agua fuera de la célula siguiendo el gradiente osmótico (1). Las hojas sufren igualmente este efecto osmótico debido a la acumulación de Na^+ en el apoplasto de las hojas (6). La salinidad reduce sustancialmente la disponibilidad de K^+ por las raíces como resultado de la actividad reducida de K^+ en la solución del suelo (2). El Na^+ compite por el K^+ por sus sitios de absorción en la membrana plasmática incluyendo a los transportadores de baja afinidad (3) y alta afinidad (4). Este último punto está en entredicho (ver texto). Finalmente, la salinidad incrementa drásticamente la pérdida de K^+ a través de los canales de K^+ rectificadores hacia fuera activados por despolarización (KOR) (5). Tomado de Shabala y Cuin (2007). En esta figura no se encuentran representados transportadores de Na^+ claves como SOS1 y HKT1.

Las células endodérmicas constituyen un importante punto de control y regulación del transporte radicular de iones desde el medio externo, debido a que la banda de células suberinizadas de Caspari es una barrera impermeable para el movimiento apoplástico de solutos (Azaizeh y Steudle 1991; Niu et al. 1995, Amaya et al. 1999), obligando a que el movimiento de agua e iones se realice de un modo simplástico. La importancia del flujo apoplástico, en contraposición al simplástico, en el flujo total de sodio de la planta, varía entre distintas especies y entre distintas condiciones de crecimiento. En arroz, se ha sugerido al apoplasto como principal vía de entrada de Na^+ (Yadav et al. 1996). En trigo, la entrada de Na^+ a través del apoplasto es 10 veces menor que en arroz (Garcia et al. 1997). En plantas de *Arabidopsis* cultivadas en presencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} , todas las vías de entrada de Na^+ contribuyen en la misma medida (Essah et al. 2003).

Con respecto al transporte simplástico de Na^+ , como se ha comentado anteriormente, el gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana plasmática de las células vegetales favorece su transporte pasivo al citosol, compitiendo con el K^+ , por los sistemas de transporte de este catión que podrían transportar Na^+ a baja afinidad (**Fig. A5**). No obstante, existe amplio consenso de que estos transportadores de K^+ exhiben una alta selectividad para este catión, por lo que no parecen estar implicados en la entrada masiva de Na^+ al simplasto de la raíz, si bien, algunos de ellos como algunos HAKs son bloqueados por concentraciones milimolares de Na^+ , lo que tiene obvias implicaciones en la absorción de K^+ y por tanto en la razón K^+/Na^+ citosólica (Rodríguez-Navarro y Rubio 2006, Shabala y Cui 2007). También, AKT1, un canal de tipo KIR (*K⁺ inward-rectifying channel*), puede ser la causa de la disminución de la absorción de K^+ inducido por elevadas concentraciones de Na^+ (Qi y Spalding 2004), debido a que la despolarización de la membrana causada por tales concentraciones externas de Na^+ hace el transporte pasivo de K^+ termodinámicamente imposible, lo que unido al incremento en la pérdida de K^+ a través de los canales de K^+ rectificadores hacia fuera activados por despolarización (KOR) (**Fig. A5**, Shabala et al. 2005), resulta, en ambos casos, en una reducción de la razón K^+/Na^+ citosólica.

La identidad molecular de los transportadores implicados en las vías de entrada masiva de Na^+ es todavía materia de debate (Yeo 2007, Apse y Blumwald 2007, Munns y Tester 2008). Así, se ha atribuido a un transportador de la familia HKT (HKT2;1), un papel relevante en la entrada de Na^+ en la planta (Tester y Davenport 2003, Apse y Blumwald 2007, y sus referencias). Sin embargo, HKT2;1, que se ha encontrado solo en

gramíneas (arroz y cebada), ubicado en el plasmalema de la epidermis y células corticales de la raíz, parece funcionar como un sistema de absorción de Na^+ de alta afinidad en la raíz, cuando se dan condiciones de deficiencia de K^+ (**Fig. A5 y A6**). Sin embargo, al inhibirse su expresión por condiciones micromolares de K^+ en el medio, incluso por concentraciones moderadas de Na^+ , no debería ser la vía masiva de entrada de Na^+ , sino mas bien, participaría en la absorción de Na^+ a alta afinidad cuando hay un medio deficiente en K^+ , y de hecho, HKT2;1 no se expresa cuando hay suficiente K^+ en el medio (Rodríguez-Navarro y Rubio 2006, Horie et al. 2007). Según estos autores, de esta forma, el Na^+ podría sustituir al K^+ en algunas de sus funciones, fundamentalmente osmóticas y a baja salinidad.

Las evidencias bioquímicas y electrofisiológicas apuntan a la actividad de los canales catiónicos no selectivos (NSCC) como los candidatos probablemente implicados en la entrada de Na^+ en la raíz (Demidchik y Tester 2002). Los NSCC son particularmente abundantes en el plasmalema de las células vegetales y exhiben una baja selectividad para el K^+ y Na^+ , comparada con los KIR (AKT) y los SKOR (*stele K⁺ outward-rectifying channel*), siendo la entrada de Na^+ a través de los primeros, mucho más alta que para los segundos y además, fuertemente afectada por Ca^{2+} , lo que explicaría en una gran medida, el alivio por la adición de Ca^{2+} de los síntomas de daño por salinidad (Demidchik y Tester 2002; Essah et al. 2003, Horie y Schroeder 2004). La identidad molecular de los NSCCs se ha atribuido a los transportadores CNGC (*cyclic nucleotide-gated channel*) y GLR (*glutamate receptor-like channel*) (**Fig. A6**, Tester y Davenport 2003, Apse y Blumwald 2007, Shabala y Cui 2007).

De las 20 isoformas existentes de esta familia de canales CNGC en Arabidopsis, solo unos pocos han sido caracterizados funcionalmente hasta la fecha, sin resultados muy concluyentes en relación a su papel en la entrada masiva de Na^+ (Maathuis 2006). AtCNGC1 y 4 son igualmente permeables a K^+ y Na^+ , mientras que AtCNGC2 parece ser exclusivo para K^+ (Leng et al. 2002). AtCNGC10 recuperó el transporte de potasio en mutantes de *E. coli* para la absorción de K^+ y levadura, así como en el mutante *akt-1* de Arabidopsis, sugiriendo una función de transporte de K^+ en la raíz (Li et al. 2005). Mutantes insercionales nulos de Arabidopsis para AtCNGC1, una isoforma que se expresa principalmente en las células epidérmicas y corticales de la raíz, crecieron mejor en altas concentraciones de NaCl que las silvestres, lo que indicaba que el flujo de entrada de Na^+ se encontraba restringido en dichos mutantes. Sin embargo, no presentaron diferencias significativas en los contenidos de Na^+ de la parte aérea

(Maathuis 2006). Por el contrario, los mutantes *cngc3*, que mostraron una menor acumulación de Na^+ en la parte aérea, no exhibieron diferencias significativas en el crecimiento en comparación con la de las silvestres (Maathuis 2006). También, se ha sugerido que una parte sustancial del eflujo de K^+ inducido por NaCl sería mediado por NSCC (Shabala et al. 2006).

En cuanto a los GLR, con 20 isoformas en *Arabidopsis*, su función está todavía lejos de ser establecida, a pesar de que se expresan ubicuamente en la planta, y algunos de ellos, son particularmente muy abundantes en raíces (Shabala y Cuin 2007).

A.2.1.1.2. Transportadores implicados en el eflujo de Na^+ : SOS1

A elevadas concentraciones externas de Na^+ , un fuerte influjo unidireccional de Na^+ medido en raíces, suele estar contrarrestado por un gran eflujo de Na^+ , y el resultado neto de estos flujos es lo que contribuye a la acumulación de Na^+ en las raíces y en el resto de la planta (Tester y Davenport 2003). El control del eflujo de Na^+ parece ser más importante que el influjo en la regulación en el transporte neto de Na^+ en glicófitas (Tester y Davenport 2003, Yeo 2007), de manera que parece establecerse un ciclo fútil de Na^+ a nivel de la membrana plasmática de las células epidérmicas y corticales de la raíz (Malagoli et al. 2008).

La extrusión de Na^+ en plantas superiores está dirigido por un sistema antiporte Na^+/H^+ (Blumwald et al. 2000; Shi et al. 2000, Pardo et al. 2006), acoplado al gradiente electroquímico de H^+ generado por la P-H^+ -ATPasa (Ballesteros et al. 1998, Sze et al. 1999, Horie y Schroeder 2004), aunque en hongos, algunas algas marinas y en la briofita *Physcomitrella* puede llevarse a cabo por bombas transportadoras de Na^+ (P-ATPasas), inexistentes en plantas superiores (Benito et al 2002 y 2003, Lunde et al. 2007). En tomate, ya existían evidencias fisiológicas (Mennen et al. 1990) y bioquímicas (Wilson y Shannon 1995, Kerkeb 2000), del funcionamiento de un antiporte Na^+/H^+ en plasmalema de raíces. A este respecto, se ha identificado en *Arabidopsis* un antiportador Na^+/H^+ codificado por el gen *SOS1* (*AtNHX7*) (Shi et al 2000). Este gen fue identificado por análisis de mutantes de *Arabidopsis* hipersensibles a estrés salino (*salt overly sensitive*, *-sos-*) y forma parte de una importante ruta reguladora de la homeostasis para el Na^+ y el K^+ bajo condiciones salinas (Zhu 2002, Pardo et al. 2006, Mahajan et al. 2008). En esta ruta reguladora están implicadas,

además del antiportador SOS1, las proteínas SOS2, una serina/treonina proteína quinasa (Liu et al 2000), y SOS3, una proteína miristoilada que une calcio y que actuaría como sensor del mismo (Liu y Zhu 1998), de forma que la activación específica de esta ruta por sal conduce al control del eflujo de Na^+ (Quintero et al. 2002, Zhu, 2002). Además de participar en la extrusión de Na^+ al medio externo, los genes de la ruta SOS juegan un papel esencial en la regulación de la homeostasis del K^+ y Na^+ y el desarrollo de la planta (**Figs. A6 y A7**). Puesto que es objetivo fundamental de este trabajo de Tesis Doctoral, la identificación funcional de la ruta SOS en tomate, cada uno de los componentes de la misma será revisado con mayor detalle en un apartado independiente (**apartado A.2.1.2**).

A.2.1.1.3. Transportadores implicados en compartimentación vacuolar de Na^+ :

NHX1

Tanto en plantas halófitas como en glicófitas tolerantes existe una clara correlación entre compartimentación vacuolar y tolerancia a la salinidad (Blumwald et al. 2000). Ello reporta dos ventajas: la recuperación de la turgencia por el ajuste osmótico con sales (como osmótico barato) y la evitación de la toxicidad iónica en el citoplasma. Esta capacidad está ligada directamente a la velocidad de crecimiento, más limitado en las raíces que en las hojas, de ahí, que una buena parte del Na^+ sea dirigido a la parte aérea, vía xilema (transporte de Na^+ a larga distancia) (**Fig. A6**, Yeo 2007). La inclusión de Na^+ y Cl^- en la vacuola, constituye, por tanto, otro de los mecanismos más importantes de control de la selectividad K^+/Na^+ en el citoplasma (y mantener una alta razón K^+/Na^+). Dicho proceso se lleva a cabo por la acción de sistemas antiportadores Na^+/H^+ que parecen estar acoplados a un gradiente electroquímico de H^+ generado por la acción de la V-ATPasa y V-PPasa de tonoplasto (Ballesteros et al. 1996, Ballesteros et al 1997, Kerkeb 2000, Blumwald et al. 2000, Gaxiola et al. 2001).

AtNHX1 fue el primer antiportador vacuolar clonado de plantas (Gaxiola et al. 1999, Quintero et al. 2000). La sobreexpresión de AtNHX1 en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, tomate y *Brassica* confería tolerancia a NaCl, lo que sugirió que AtNHX1 era la proteína responsable de la compartimentación de Na^+ en la vacuola (Apse et al. 1999, Zhang y Blumwald 2001, Zhang et al. 2001). Los estudios bioquímicos llevados a cabo con la proteína, purificada y reconstituida en liposomas revelaron que AtNHX1

transportaba K^+ y Na^+ a similar afinidad (Venema et al. 2002). Ello unido a los resultados obtenidos con mutantes insercionales para este gen sugirió que AtNHX1 tenía además un papel importante en la regulación de la homeostasis de K^+ y pH (Venema et al. 2002, Apse et al. 2003, Sottosanto et al. 2004, Pardo et al. 2006). La expresión de *AtNHX1* se indujo por sal y ABA (Quintero et al. 2000), encontrándose 5 isoformas adicionales en *Arabidopsis*, con un patrón de expresión diferencial dependiente de tejido y estrés (Yokoi et al. 2002). Las isoformas AtNHX1 a 4 pertenecen a la clase I de la subfamilia de los NHE/NHX encuadrada dentro del subgrupo intracelular (IC) (Brett et al. 2005), que se caracterizan por su localización vacuolar, catalizando el intercambio Na^+/H^+ o K^+/H^+ con una afinidad similar, mientras que AtNHX5 y 6 pertenecen a la clase II de este mismo subgrupo, caracterizados por su localización endosomal y una mayor afinidad por el K^+ que por el Na^+ en su intercambio con H^+ (Yokoi et al. 2002, Venema et al. 2003, Pardo et al. 2006).

Miembros de nuestro grupo han identificado en tomate, los genes LeNHX1, 2, 3 y 4, que codifican proteínas antiportadoras $K^+, Na^+/H^+$ de membranas intracelulares (Rodríguez-Rosales et al. 2009). LeNHX2 es el primer antiportador K^+/H^+ descrito en plantas, localizado en membranas de Golgi o prevacuolas (Venema et al. 2003) y cuya sobreexpresión en *Arabidopsis* confiere tolerancia a NaCl mediante la mejora de la nutrición de K^+ en estas plantas (Rodríguez-Rosales et al. 2008).

Además de AtNHX1, se ha identificado en el genoma de *Arabidopsis*, un gran número de genes que codifican proteínas que forman parte de la superfamilia de antiportadores catión/protón (CPA, *Cation/Proton Antiporters*), que pueden intercambiar Ca^{2+} , Na^+ y K^+ con H^+ (Mäser et al. 2001). Estas proteínas pueden dividirse en las siguientes subfamilias: CPA1, constituida por las proteínas tipo NHX (6) y NhaP/SOS1 (2); CaCA (12), que contiene a los 11 genes que codifican a las proteínas CAX y un gen que codifica a MHX1 (Hepler et al. 2005); CCC (1) que funciona como un simportador $NaCl/KCl$ (K^+ , Na^+ y Cl^-) (Colmenero-Flores et al. 2007); NhaD (2) que podría funcionar como antiportadores $Na^+(Li)/K^+ -H^+$ (Barrero-Gil et al. 2007); y CPA2, constituida por transportadores del tipo CHX (28) y KEA (6). La actividad de los transportadores CHX o KEA de plantas no ha sido claramente determinada, si bien para el caso de los CHX, algunas isoformas se han relacionado con la homeostasis de K^+ (Pardo et al. 2006). No obstante, el mutante insercional de *Arabidopsis chx21* mostró una baja concentración de sodio en el xilema así como en hojas, sugiriendo que AtCHX21 puede contribuir al eflujo de Na^+ desde las células

endodérmicas hacia el apoplasto de la estela (**Fig. A6**, Hall et al. 2006).

Es muy probable que NHX1 no sea el único antiportador responsable de la acumulación vacuolar de Na^+ , y que algunas de estas isoformas pudieran estar también implicadas. A este respecto, recientemente se ha reevaluado el papel de AtNHX1 en la tolerancia a la salinidad mediante la sobreexpresión del mismo en Arabidopsis y tomate (Leidi et al. 2005, Barragán 2007, Yang et al 2008). La sobreexpresión de AtNHX1 no reprodujo los resultados previamente obtenidos en ambas especies (Apse et al 1999, Zhang y Blumwald 2001). En tomate, líneas sobreexpresoras de AtNHX1 mostraron una mayor absorción de K^+ que las líneas control, que incrementaba el *pool* vacuolar de K^+ a expensas del citoplásmico (Leidi et al. 2005, Barragán 2007), probablemente debido a su actividad incrementada como antiportador K^+/H^+ vacuolar (Venema et al 2002). Ello producía, sin embargo, un fenotipo paradójico de deficiencia de K^+ , que induciría la señal de deficiencia de este catión, lo que estimularía una mayor absorción del mismo por las raíces (Leidi et al. 2005, Barragán 2007). Por todo ello, puede que sea necesario reexaminar la función de este antiportador, y proseguir con la caracterización funcional de todos estos genes hasta conocer qué transportador(es) es el principalmente implicado en la acumulación vacuolar de Na^+ , como proceso clave implicado en la tolerancia del tejido a la salinidad.

A.2.1.1.4. Transportadores implicados en el transporte de Na^+ larga distancia:

SOS1 y HKT

El antiportador Na^+/H^+ , AtSOS1, se expresa preferencialmente en las células epidérmicas del ápice de la raíz y en las células parenquimáticas que cargan al xilema en raíz, hojas e inflorescencias de Arabidopsis (Shi et al. 2002). Este hecho y el que plantas mutantes *sos1* acumularan menos Na^+ en la parte aérea bajo un estrés salino moderado, mientras que bajo un estrés severo lo acumularan más que el fenotipo silvestre demostraba que SOS1 estaba implicado en el transporte de Na^+ a larga distancia, controlando la carga xilemática del catión, y por tanto, la cantidad que llega a la parte aérea (Shi et al 2002). Ello ha llevado a estos autores a postular que SOS1 actuaría de forma bidireccional, extrayendo Na^+ del xilema con intercambio de K^+ para evitar efectos tóxicos en la parte aérea bajo estrés severo y recargando con Na^+ a costa del K^+ en condiciones de estrés moderado para un adecuado ajuste osmótico en las hojas.

Esta hipótesis de SOS1 trabajando en reverso para retirar Na^+ del xilema en condiciones de alta salinidad está actualmente puesta en entredicho (Apse y Blumwald, 2007), sobre todo, a la luz del preponderante papel del transportador de Na^+ , AtHKT1, en la retirada de Na^+ del xilema, y que al igual que SOS1, se expresa preferentemente en las células parenquimáticas del xilema (Berthomieu et al. 2003, Sunarpi et al. 2005). El papel de HKT1 y de sus homólogos descritos en plantas será revisada mas abajo dentro de este apartado. Es muy probable que a alta salinidad, la carga de Na^+ en el xilema sea pasiva, debido a la alta concentración de Na^+ citosólico en las células del parénquima del xilema y a una membrana plasmática despolarizada, que podría favorecer el movimiento de Na^+ hacia el xilema, por ejemplo, a través de los canales SKOR, que poseen una alta permeabilidad al Na^+ (Apse y Blumwald 2007). Bajo estas condiciones, el Na^+ podría acumularse rápidamente en la parte aérea, saturando la capacidad de la vacuola para compartimentar dichos iones. En estas condiciones, puede que SOS1 actúe recargando con Na^+ el xilema mediante el flujo de Na^+ desde las células del parénquima xilematico de las hojas, posibilitando, así, una velocidad neta de acumulación de Na^+ que permita su compartimentación sostenible en las vacuolas de las células de las hojas en expansión o bien, evitando su acumulación en hojas jóvenes escasamente vacuoladas.

Concordante con esta hipótesis, recientemente, se ha encontrado en Arabidopsis, un homólogo de SOS3, CBL10 (SCaBP8), que se expresa solo en la parte aérea, a diferencia de SOS3, que se expresa únicamente en raíces, y que parece estar también implicado en la tolerancia a la sal regulando la acumulación de Na^+ en la parte aérea, a través de la formación del complejo CBL10 (SCaBP8)/SOS2 (Quan et al. 2007, Kim et al 2007). CBL10 (SCaBP8) reclutaría a SOS2 a la membrana plasmática para activar SOS1 y su actividad extractora de Na^+ en las células del mesófilo de las hojas (**Fig. A6**, Quan et al. 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, además de SOS1, los transportadores de tipo HKT juegan un importante papel en el control la homeostasis de Na^+ y K^+ a través de su participación en el transporte de Na^+ a larga distancia (Rodriguez-Navarro y Rubio 2006, Pardo et al 2006). Aunque homólogos a los transportadores de K^+ de tipo TRK de hongos (Rodriguez-Navarro, 2000), las proteínas HKTs son transportadores de Na^+ ubicados en el plasmalema de diversos tipos celulares dependiendo de la especie analizada (Rodriguez-Navarro y Rubio 2006). HKT1 de trigo (TaHKT2;1) fue inicialmente caracterizado como un simportador K^+-H^+ , que mediaba la absorción de K^+

de alta afinidad en raíces (Schatmann y Schroeder 1994), y posteriormente, como un cotransportador de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en levaduras y oocitos de *Xenopus* (Rubio et al. 1995). Aunque su función como transportador de K^+ de alta afinidad no puede ser descartada, nunca se ha demostrado dicha función en cereales (Rodríguez-Navarro y Rubio 2006). Esta controversia puede provenir de los artefactos de expresión en sistemas heterólogos, como levaduras, derivados de las secuencias nucleotídicas del vector de expresión usado aguas arriba del inserto, que determinan codones de inicio de traducción alternativos, dando lugar a una menor expresión de la proteína que alteran sus propiedades de transporte (Haro et al. 2005, Bañuelos et al. 2008).

AtHKT1;1, único miembro de esta familia en *Arabidopsis* (Uozomi et al. 2001, Maser et al. 2001), se expresa en las células parenquimáticas que cargan el xilema de raíces y hojas (Sunarpi et al. 2005), y es un importante determinante de tolerancia a la sal en *Arabidopsis* al participar en la redistribución de Na^+ en raíz/parte aérea, reduciendo su acumulación en hojas (**Fig. A6**, Mäser et al. 2002). El fenotipo de las líneas mutantes de AtHKT1;1 (*athkt1*) se caracteriza por una alta sensibilidad a la sal asociada a una hiperacumulación de Na^+ en la parte aérea e hipoacumulación de Na^+ en raíces (Rus et al. 2004, Sunarpi et al. 2005). No obstante, la mutación en AtHKT1;1 fue capaz de rescatar el fenotipo sensible a la sal de plantas mutantes *sos* (Rus et al. 2001 y 2004), pero no parece participar en la absorción de Na^+ por las raíces, ya que el influjo unidireccional del catión no se afectó en los mutantes *athkt1* (Essah et al. 2003, Davenport et al. 2007). Si bien, se ha sugerido su participación en procesos de recirculación de Na^+ vía floemática (**Fig. A6**, Berthomieu et al. 2003), la función más aceptada de AtHKT1;1 es la del control de la velocidad de transporte de Na^+ de las raíces a la parte aérea, retirando o reabsorbiendo el ión desde los vasos xilemáticos a las células parenquimáticas del xilema de hojas y raíces (Sunarpi et al. 2005, Davenport et al. 2007). Una de las 9 isoformas de HKT previamente descritas en arroz (Garcíadeblás et al. 2003), OsHKT8 (OsHKT1;5), parece funcionar de forma análoga a AtHKT1;1, al estar implicado en la retirada de Na^+ del xilema e, indirectamente, en la regulación de la homeostasis de K^+ (Ren et al. 2005).

Mientras que en dicotiledóneas, como *Arabidopsis* y otras especies se han identificado un miembro, y en *Eucalyptus* o en *Mesembryanthemum*, al menos dos miembros, en gramíneas, se han descrito hasta 9 genes en arroz y un número similar en trigo y cebada (Uozomi et al. 2001, Mäser et al. 2001, Garcíadeblás et al. 2003, Platten et al. 2006, Huang et al. 2008). Basada en la estructura génica y su secuencia

aminoacídica, esta familia de transportadores se subdividen en dos subfamilias, diferenciadas esencialmente por el tamaño de sus dos intrones y la presencia de un determinado aminoácido en el bucle del primer poro (estructura típica de 4 dominios MPM -membrana-poro-membrana) que puede ser clave en la selectividad de Na^+ y K^+ (Platten et al 2006).

Los miembros de la subfamilia 1 tiene un residuo de serina que es reemplazado por glicina en los de la subfamilia 2, si bien su papel en la selectividad Na^+/K^+ se ha puesto en entredicho (Rodríguez-Navarro y Rubio 2006). A la primera subfamilia pertenecen todos los HKTs descritos hasta la fecha en dicotiledóneas, y también algunos miembros de gramíneas, con AtHKT1;1 y OSHKT1;5 como proteínas tipo. Todos son transportadores de Na^+ de baja afinidad que se localizan en la membrana plasmática de las células parenquimáticas que cargan al xilema donde retiran Na^+ de la savia xilemática previniendo su acumulación en la parte aérea (**Fig. A6**, Ren et al. 2005, Rus et al 2005, Rodríguez-Navarro y Rubio 2006, Munns y Tester 2008, Huang et al. 2008). La subfamilia 2 solo incluye hasta la fecha miembros de gramíneas y tiene como representante tipo, el HKT2;1 de arroz, cebada y trigo, que es un transportador de Na^+ de alta afinidad, inhibible por K^+ , ubicado en las células epidérmicas y corticales de la raíz y que sería el responsable en gran medida de la entrada de Na^+ , sobre todo en condiciones de deficiencia de K^+ (ver **apartado A.2.1.1.1., Fig. A6**, Garcíadeblás et al. 2003, Horie et al. 2007). Hasta el momento no se han descrito en dicotiledoneas miembros de esta subfamilia.

La relevancia de los transportadores HKT en el mecanismo de tolerancia a la salinidad se ha puesto de manifiesto en trabajos donde este tipo de transportadores se ha asociado con QTLs de halotolerancia relacionados con la homeostasis de K^+ y Na^+ en la parte aérea. La identificación de un gen que codifica a un transportador de Na^+ en arroz, *SKCI*, que se corresponde con el gen *OsHKT1;5*, fue responsable por sí solo de un importante QTL que determina la acumulación selectiva de K^+ sobre la de Na^+ en una variedad tolerante de arroz (Ren et al. 2005). *OsHKT1;5* es un transportador específico de Na^+ que resultó ser más activo en la variedad tolerante que en la sensible, correlacionándose con una menor acumulación de Na^+ a la vez que una mayor de K^+ en la parte aérea. Se demostró que la causa de su mayor actividad no fue debido a una mayor expresión del mismo en la variedad tolerante, sino a variaciones en algunos aminoácidos (concretamente de 4) en la secuencia codificante del alelo tolerante, que le

procuraba una mayor eficacia en la descarga de Na^+ del xilema, e indirectamente, una mejora en la razón K^+/Na^+ de la parte aérea (**Fig. A6**).

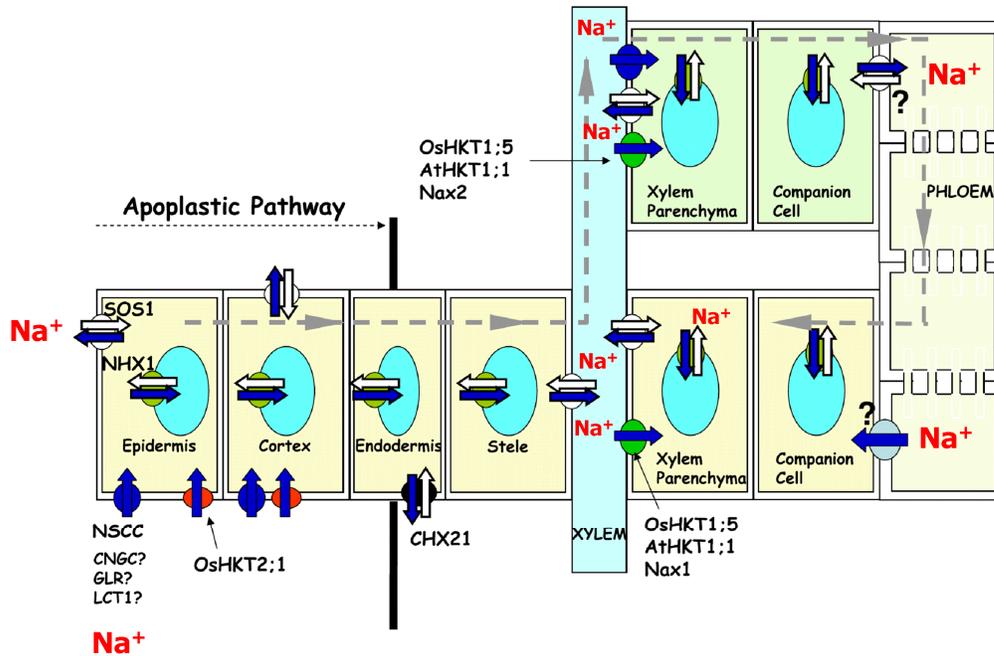


Figura A6. Esquema general de transporte de Na^+ a nivel de la planta entera mostrando los diferentes transportadores de Na^+ implicados en el transporte radial y longitudinal del ión desde el suelo a través de las raíces, su carga en el xilema en dirección a la parte aérea y recirculación a través de la planta. El Na^+ entra en el simplasto de la raíz, via NSC, y probablemente, otros transportadores. Se mantiene una baja concentración citosólica de Na^+ por la acción de los antiportadores Na^+/H^+ de membrana plasmática y vacuolar, SOS1 y NHX1, respectivamente. El antiportador catión/ H^+ de tipo CHX (CHX21) contribuye al movimiento de Na^+ desde las células endodérmicas al apoplasto de la estela. En la estela, el Na^+ es cargado en el xilema por el antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática, SOS1 en la raíz, el Na^+ puede ser descargado del xilema en la raíz, vía uniportadores selectivos (AtHKT1;1, OsHKT1;5, Nax1). En las hojas, el Na^+ puede ser descargado por uniportadores selectivos (AtHKT1;1, OsHKT1;5, Nax2) y NSCC. En las hojas, se mantiene una baja concentración citosólica de Na^+ por la acción de los antiportadores Na^+/H^+ de membrana plasmática y vacuolar, tipo SOS1 y NHX1, respectivamente. El mecanismo de carga y descarga floemática y la recirculación de Na^+ vía floema están por determinar. Tomado de Apse y Blumwald (2007).

Asimismo, se han identificado en trigo duro dos loci, *Nax1* y *Nax2*, ambos determinando una menor acumulación de Na^+ y subsiguientemente, una mayor razón K^+/Na^+ en las hojas (**Fig. A6**, James et al. 2006). *Nax2* funciona en raíces reduciendo el transporte de Na^+ desde la raíz a la parte aérea, y el locus *Nax1* mejora la retención en la

vaina, restringiendo la cantidad de Na^+ que llega a la hoja. El mapeo de alta resolución de la región del locus *Nax1* identificó el gen *TmHKT7-A1*, que fue polimórfico entre las líneas tolerantes a la sal y las sensibles y cosegregó con *Nax1* (Huang et al. 2006). Mientras que el gen *TmHKT1;5* podría ser el candidato del locus *Nax2*, no encontrándose variación alélica alguna, sino su ausencia o presencia del mismo entre las líneas (Byrt et al. 2007). Por el contrario, en dos ecotipos de *Arabidopsis* tolerantes a la salinidad, caracterizados por una mayor acumulación de Na^+ en la parte aérea, se correlacionó con la presencia de un alelo de *AtHKT1*, que presentaba una expresión reducida en raíces debido a una delección en tandem de una secuencia repetitiva 5kb aguas arriba de su codón de inicio (Rus et al. 2006), lo que parecía impedir la retirada de Na^+ del xilema, conduciendo a unos niveles elevados de catión en la parte aérea, rasgo que sin embargo se asociaba con una mejor tolerancia a la sal en estos ecotipos. Los resultados obtenidos en *Arabidopsis* sugieren, por tanto, que *AtHKT1;1* y *SOS1* deben estar estrechamente coordinados para el control del transporte de Na^+ a larga distancia, si bien, *HKT* parece no depender de *SOS3* (Pardo et al 2006, **Fig. A6**).

A.2.1.2. Ruta SOS: descripción de sus componentes

El trabajo que conduce al descubrimiento de los genes SOS fue iniciado en 1996 por Zhu y colaboradores (Universidad de Arizona) (Wu et al. 1996). En un cribado, de aproximadamente 250,000 semillas mutadas con varios agentes mutagénicos se recuperaron más de 40 líneas de mutante *sos* (*salt overly sensitive*-extremadamente sensibles a la sal-). Los mutantes *sos* eran específicamente hipersensibles a altos contenidos externos de Na^+ o Li^+ y eran incapaces de crecer a bajas concentraciones de K^+ externo (Zhu 2002).

En el módulo funcional SOS participan esencialmente los genes *SOS1*, que codifica un antiportador Na^+/H^+ de plasmalema (Shi et al. 2000 y 2002), *SOS2*, una serina/treonina proteína quinasa (Liu et al. 2000), y *SOS3*, una proteína miristoilada que une calcio y que actuaría como sensor del mismo (Liu y Zhu 1998), de forma que la activación específica de esta ruta por sal conduce al control del eflujo de Na^+ y su transporte a larga distancia desde la raíz a la parte aérea, condicionando la tolerancia relativa de la planta a este factor (**Fig. A6, A7 y A8**, Zhu 2002, Shi et al. 2002). Esta ruta de señalización del estrés iónico es específica de plantas, ausente en levaduras e

independiente de ABA (Xiong y Zhu 2001, Serrano y Rodríguez-Navarro 2001), por lo que otros aspectos de dicha señalización dependiente de ABA o del estrés osmótico dependiente o independiente de ABA no serán revisados en esta memoria (dichos aspectos son revisados en Xiong y Zhu 2001 y 2002, Zhu 2002).

En *Arabidopsis*, el estrés salino induciría un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Knight et al. 1997), señal que sería detectada por la proteína codificada por SOS3 (Liu y Zhu 1998, Ishitani et al 2000). SOS3 activa e interacciona físicamente con la serina/treonina proteína quinasa, SOS2 (Halfter et al 2000). Este complejo SOS2/SOS3 incrementa el nivel de expresión de SOS1 (Shi et al. 2000) y su actividad de transporte (Qiu et al 2002).

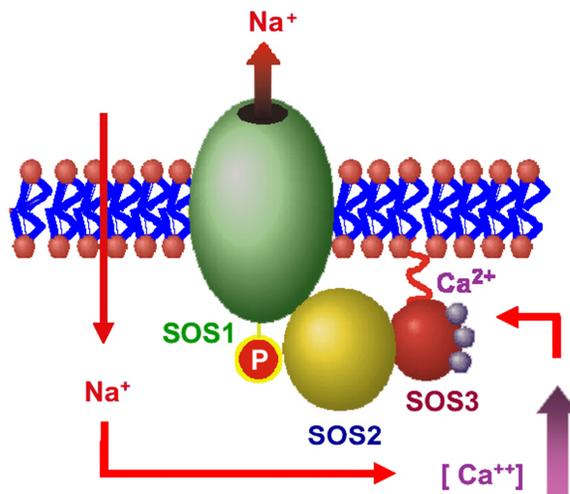


Fig. A7. Una alta concentración de sal externa dispara una señal de Ca^{2+} en el citosol que activaría a SOS3, que interacciona específicamente con SOS2. Este complejo SOS2/SOS3 fosforilaría a SOS1 activando el eflujo de Na^+ a través del plasmalema. La activación por fosforilación de SOS1 por SOS2, requiere el anclaje a la membrana plasmática del complejo SOS2/SOS3, a través de la miristoilación del N-terminal de SOS3 (Zhu 2002).

Además de SOS1, SOS2/SOS3 podría regular (positiva o negativamente) otros transportadores implicados en la homeostasis iónica en condiciones de estrés salino. Así, AtSOS2 parece regular otros transportadores implicados en la compartimentación vacuolar de Na^+ , en condiciones de estrés salino como la H^+ -ATPasa vacuolar, y los antiportadores de Na^+/H^+ , NHX1 y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, CAX1 (Fig. A8, Qiu et al. 2004, Cheng et al. 2004, Batelli et al. 2007).

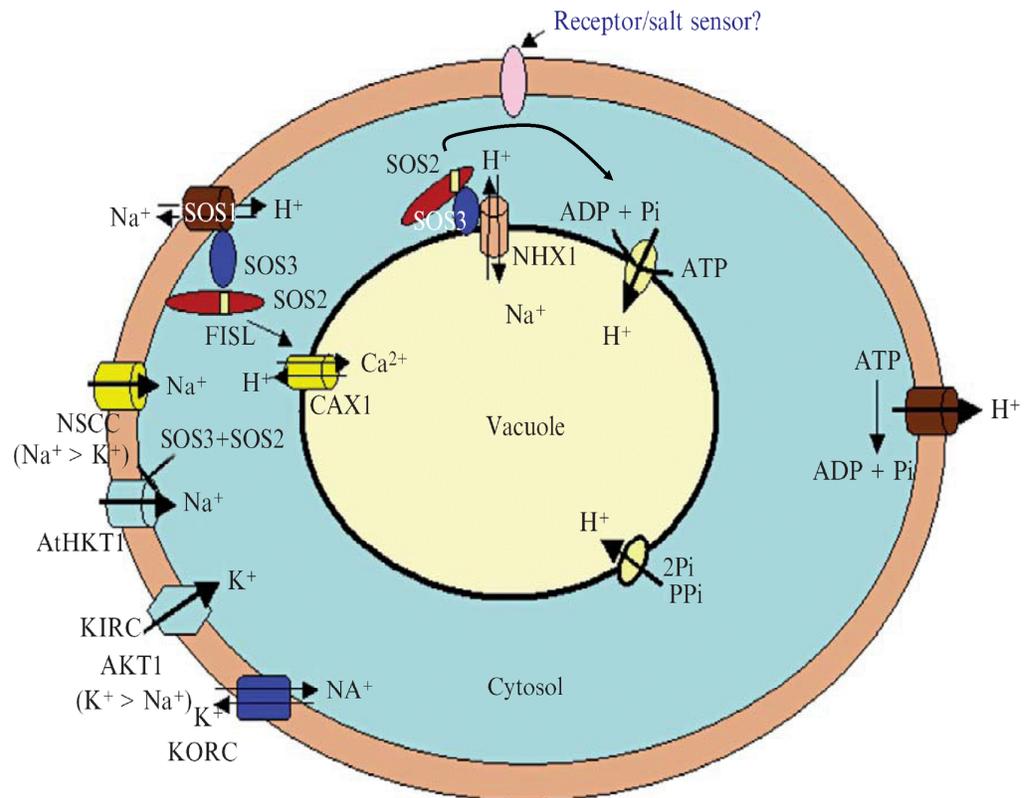


Figura A8. Regulación de la homeostasis iónica celular por la ruta SOS en *Arabidopsis*. La señal de estrés salino es percibida por un sensor o receptor presente en la membrana plasmática (todavía desconocido), responsable de la activación de varias transportadores iónicos presentes en la membrana plasmática y vacuolar. Esta señal, induce un incremento en el Ca^{2+} citosólico que es detectado por SOS3, que activa a SOS2. Dicho complejo pueden regular algunas de estos transportadores, como KIRC (AKT1), NSCC, KORC, SOS1 en la membrana plasmática, y NHX1, CAX1 y la V-ATPasa en la membrana vacuolar. La extrusión de Na^+ al medio externo por SOS1 es energizado por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. Tomado de Tuteja (2008).

A continuación se describirán con más detalle cada uno de los miembros de la ruta SOS en plantas.

A.2.1.2.1. SOS1

El antiportador SOS1 pertenece a la subfamilia NhaP, dentro de la familia de proteínas CAP1, relacionada, aunque claramente diferenciada, con la subfamilia NHE/NHX (Brett et al. 2005, Pardo et al. 2006, **Fig. A9**). En una clasificación previa, SOS1 se denominó como NHX7, y fue incluido en la subfamilia NHX de antiportadores Na^+/H^+ ,

debido a las similitudes existentes entre ambos tipos de transportadores (Mäser et al. 2001).

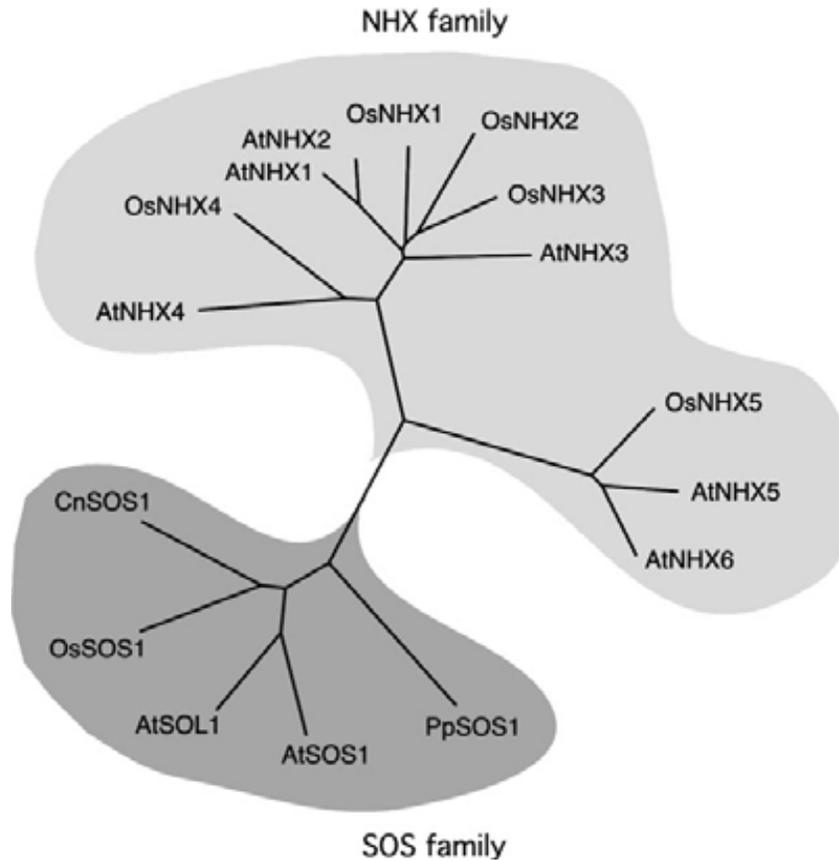


Figura A9. Árbol filogenético de los antiportadores *NhaP/SOS1* y *NHE/NHX*. Tomado de Pardo et al. (2006).

El gen *SOS1* fue aislado de *Arabidopsis* mediante clonaje posicional (Shi et al. 2000). La comparación de la secuencia nucleotídica del marco abierto de lectura (ORF) con la secuencia genómica reveló la existencia de 22 intrones y 23 exones, codificando a una proteína con una masa molecular estimada de 127 kDa. La secuencia aminoacídica de *SOS1* posee una región N-terminal altamente hidrofóbica, y orientada hacia el citoplasma, 12 dominios transmembrana, y una cola hidrófila extremadamente larga en el extremo C-terminal. El análisis filogenético ha puesto de manifiesto que *SOS1* parece más relacionado con antiportadores Na^+/H^+ de membrana celular como *SOD2*, *NHA1*, *NhaA* y *NhaP*. *SOD2* y *NHA1* funcionan eliminando el exceso de Na^+ del citosol al espacio extracelular para *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, y *NhaA* y *NhaP* actúan como antiportadores Na^+/H^+ en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (Shi et al 2000, y sus referencias). Con

excepción del transportador SOS1 de *Arabidopsis* y el de *Populus euphratica*, la localización subcelular y caracterización bioquímica del resto de los transportadores NhaP eucarióticos no se encuentra disponible por el momento. A diferencia de los transportadores NHX localizados principalmente en membranas intracelulares (Pardo et al., 2006), SOS1 se localiza en membrana plasmática (Shi et al., 2002).

Los niveles de transcrito de SOS1 están positivamente regulados por el estrés salino pero no por ABA o frío, siendo más abundante en raíces que en parte aérea (Shi et al. 2000). En plantas mutantes *sos3* de *Arabidopsis*, no se observó regulación de la transcripción de SOS1 en respuesta al estrés salino ni en raíz ni en parte aérea. Sin embargo, en mutantes *sos2*, la transcripción de SOS1 si que estaba regulada por estrés salino en raíces aunque no en parte aérea. Resultados posteriores han mostrado que un homólogo de SOS3, SCaBP8/CBL10, que se expresa solo en la parte aérea, activa e interactúa con SOS2 para formar el complejo SCaBP8/CBL10/SOS2 (Quan et al. 2007, Kim et al 2007). SCaBP8/CBL10 reclutaría a SOS2 a la membrana plasmática para activar SOS1 y su actividad extractora de Na⁺ en las células del mesófilo de las hojas (**Fig. A6**, Quan et al. 2007, Lin et al 2009).

Aunque durante mucho tiempo se especuló con que la larga cola citoplasmática de SOS1 podía intervenir en la interacción con proteínas reguladoras implicadas en el control del estrés salino y respuestas a otros tipos de estrés, su función fue totalmente desconocida durante bastante tiempo. Fueron los estudios orientados a buscar la conexión entre el estrés oxidativo y el estrés salino los que encontraron una respuesta en este sentido. Diferentes tipos de estrés ambiental, incluidos el estrés salino, provocan la acumulación de altos niveles de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Ashraf 2009 y sus referencias). Inicialmente, niveles bajos de estas ROS pueden funcionar como reguladores de la activación de genes implicados en la respuesta de defensa celular. Sin embargo, una producción y acumulación excesiva de ROS tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), superóxido (O²⁻) y radicales hidroxilo (OH[·]) pueden perturbar la homeostasis celular redox, dando lugar a daños oxidativos. Algunos estudios han demostrado que la proteína RCD1 (*radical-induced cell death*) es un importante regulador transcripcional de la respuesta al estrés oxidativo y que puede estar implicada en una gran variedad de respuestas al estrés abiótico en plantas (Belles-Boix et al. 2000; Ahlfors et al. 2004). En un estudio reciente se descubrió que el extremo C-terminal de SOS1 interaccionaba con RCD1 tanto en condiciones de estrés salino como de estrés oxidativo (Katiyar-Agarwal et al. 2006). Dicho estudio es de particular interés ya que

determina la acción de un gen, previamente no caracterizado, RCD1, implicado en la respuesta a estos dos tipos de estrés, además de elucidar el papel de SOS1 en la tolerancia al estrés oxidativo. Muy recientemente, se ha descrito que el incremento de la estabilidad del ARNm de *AtSOS1* inducida por sal, estaría mediada por la producción apoplástica de ROS a través de la actividad NADPH oxidasa inducida por la sal (Chung et al. 2008). Estos resultados sugieren que SOS1, al regular el pH apoplástico y la producción de ROS extracelular, participaría en pasos iniciales de la ruta de transducción común a varios estreses abióticos.

AtSOS1 es un transportador altamente específico para el Na^+ y parece incapaz de transportar otros cationes monovalentes como K^+ o Li^+ en plantas (Shi et al. 2002; Quintero et al. 2002). No obstante, tanto AtSOS1 como las isoformas CnSOS1A y CnSOS1B, aisladas de la planta marina *Cymodocea nodosa* fueron capaces de transportar K^+ a baja afinidad cuando se expresaban en bacterias (Garcíadeblas et al. 2007). La actividad de antiportadora Na^+/H^+ , medida en vesículas de membrana plasmática aislada de mutantes *sos1* de *Arabidopsis*, fue un 80% inferior a la de las plantas silvestres (Qiu et al. 2002). La adición de SOS2 *in vitro* aumentaba la capacidad antiportadora al doble comparado con la de las vesículas sin SOS2 añadido. También, la adición de SOS2 activado (una versión de SOS2 independiente de SOS3, Guo et al. 2001) a vesículas procedente de mutantes de *Arabidopsis sos2* y *sos3* incrementaba notablemente dicha actividad, pero no las de las plantas mutantes *sos1*, mostrando inequívocamente la función de SOS1 y de sus proteínas reguladoras SOS2 y SOS3 en el intercambio Na^+/H^+ en las vesículas de membrana plasmática de raíces (Qiu et al., 2002).

Los grupos de JM Pardo y de JK Zhu lograron reconstituir el sistema SOS de *Arabidopsis* en levadura (Shi et al 2002, Quintero et al. 2002). Así, la expresión de AtSOS1 en cepas de levaduras AXT3K, hipersensibles a la sal, por ser defectivas en los principales transportadores de Na^+ conocidos, restauraba parcialmente la tolerancia al NaCl, y ello se correlacionaba con un menor contenido intracelular de Na^+ (Shi et al. 2002, Quintero et al. 2002). Además, la coexpresión de AtSOS2 y AtSO3 en dicha cepa que ya expresaba AtSOS1, incrementó fuertemente la tolerancia de las células transformadas, lo que indicaba la participación de las tres proteínas en el mismo módulo funcional (Quintero et al. 2002). Además, la coexpresión de la versión hiperactiva de la proteína SOS2 independiente de SOS3 (Guo et al 2001), incrementó la tolerancia inducida por SOS1 en la cepa AXT3K (Quintero al., 2002). Todos estos resultados

demostraban adicionalmente la participación de las tres proteínas en el mismo módulo funcional (Shi et al 2002, Quintero et al. 2002).

Un estudio funcional llevado a cabo en arroz ha demostrado que la ruta SOS está conservada en monocotiledóneas (Martinez-Atienza et al. 2007). En dicho estudio se identificó el gen de arroz que codificaba al antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática, OsSOS1, que en base a sus características moleculares y bioquímicas se ha descrito como el homólogo funcional de AtSOS1. OsSOS1 fue capaz de intercambiar Na^+ por H^+ en vesículas de levaduras enriquecidas en membrana plasmática, al tiempo que redujo su contenido en Na^+ intracelular. Asimismo, el complejo quinasa de *Arabidopsis* AtSOS2/AtSOS3, que activa AtSOS1, fue capaz de fosforilar OsSOS1 y así estimular su actividad tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, OsSOS1 suprimió la hipersensibilidad al estrés salino de los mutantes *sos1-1* de *Arabidopsis*. En este mismo trabajo, también se describen en arroz la identificación de OsCIPK24 y OsCBL4, que son los respectivos homólogos putativos de AtSOS2, , y de su activador dependiente de Ca^{2+} , AtSOS3. OsCBL4 y OsCIPK24 actuaban de manera coordinada para activar OsSOS1 en células de levaduras, y podían además ser intercambiados por sus homólogos de *Arabidopsis* para formar el módulo quinasa que activaba tanto a OsSOS1 como a AtSOS1, y finalmente, ambos fueron capaces de suprimir la sensibilidad a la sal de los mutantes *sos2/cipk24* y *sos3/cbl4* de *Arabidopsis*, respectivamente.

También, se ha aislado el gen *SOS1* de la especie tolerante a la sal, *Populus euphratica* (Wu et al. 2007). El gen aislado tiene un ORF de 3438 pb y un peso molecular estimado de 127 kDa. El análisis de su secuencia reveló 12 sitios transmembrana además de una larga cola citoplasmática en el extremo C-terminal. PeSOS1 tiene un 64% de homología con la secuencia aminoacídica de SOS1 de *Arabidopsis*, y mediante estudios de inmunolocalización se localizó predominantemente en la membrana plasmática. Es interesante destacar que a pesar de que los niveles de proteína de PeSOS1 estaban positivamente regulados por el estrés salino, el nivel de ARNm permanecía relativamente constante en estas condiciones. Uno de los resultados más sorprendentes de este estudio es el hecho de que PeSOS1 fuera capaz de suprimir el fenotipo de hipersensibilidad a la sal en los mutantes bacterianos EP432 deficiente en dos antiportadores Na^+/H^+ EcNhA y EcNhB, puesto que hasta el momento todos los estudios de funcionalidad se habían tenido que realizar en mutantes de levadura, dado la presunta toxicidad de esta proteína para las bacterias (Wu et a. 2007). En *Thellungiella halophylla*, una especie halófila muy próxima a *Arabidopsis*, se observó un incremento

en la expresión de *SOS1* en raíces y hojas de plantas control y tratadas con sal (Oh et al 2007), indicando que la ruta SOS no es exclusiva de plantas glicófitas (capaces de crecer a concentraciones de sal menores de 100 mM) como *Arabidopsis*, sino que es efectivamente funcional en halófitas (capaces de crecer a concentraciones de sal de más de 250 mM).

En base al patrón de expresión de *SOS1* y las características fisiológicas de las plantas mutantes *sos1*, se propuso que *SOS1* pudiera estar implicado en el transporte a larga distancia de Na^+ en *Arabidopsis* (Shi et al. 2002). El patrón de expresión de *SOS1* se analizó mediante la fusión del promotor de *SOS1* al gen reportero *GUS*, detectándose dicha actividad principalmente en los tejidos internos que rodean la vasculatura de la planta completa. En la raíz, la actividad *GUS* se detectó principalmente en el periciclo y en las células parenquimáticas que bordean los vasos del xilema. En el tallo y peciolo, la actividad *GUS* se restringía a las células parenquimáticas de la interfase xilema/simplasto. Adicionalmente, la expresión de *SOS1* también se detectó en las células epidérmicas del ápice de la raíz. Puesto que este tipo de células epidérmicas están indiferenciadas y carecen de vacuolas lo suficientemente grandes para compartimentar el exceso de Na^+ , la extrusión activa del Na^+ citoplasmático ejercido por *SOS1* sería fundamental para prevenir la acumulación de este ión en el ápice de la raíz.

Por otra parte, la expresión preferencial de *SOS1* en las células parenquimáticas que rodean al xilema sugiere un papel de este transportador en el transporte de Na^+ a larga distancia, ya que el Na^+ es transportado de la raíz a la parte aérea vía xilema. Este hecho y el que plantas mutantes *sos1* de *Arabidopsis* acumularan menos Na^+ en la parte aérea sometidas a un estrés salino moderado, mientras que bajo un estrés severo lo acumularan más que el fenotipo silvestre demostraba que *SOS1* estaba implicado en el transporte de Na^+ a larga distancia, controlando la carga xilemática del catión, y por tanto la cantidad que llega a la parte aérea (Shi et al 2002). Ello ha llevado a estos autores a postular que *SOS1* actuaría de forma bidireccional, extrayendo Na^+ del xilema con intercambio de K^+ para evitar efectos tóxicos en la parte aérea bajo estrés severo y recargando con Na^+ a costa del K^+ en condiciones de estrés moderado para un adecuado ajuste osmótico en las hojas (aspecto discutido en **apartado A.2.1.1.4**).

Estudios electrofisiológicos también han mostrado que *AtSOS1* estaba implicado en la homeostasis del K^+ intracelular. Así, mediante el análisis de los flujos netos de K^+ , H^+ y Na^+ con la técnica no invasiva MIFE, se demostró que la mutación de *sos1* afectaba a

la homeostasis del K^+ intracelular a través del incremento en la pérdida de K^+ a través de los canales de K^+ rectificadores hacia fuera activados por despolarización (KOR), circunscribiéndose no solo al ápice de la raíz, sino también a la raíz completa (Shabala et al. 2005). Dicha mutación afectaba además al transporte de H^+ , incluso en ausencia de estrés salino. Asimismo, SOS1 podría funcionar también protegiendo el transporte de K^+ en la membrana plasmática durante el estrés salino (Qi y Spalding, 2004). Se había observado que la capacidad para tomar K^+ por las células de la raíz de estos mutantes, medido electrofisiológicamente, no se afectaba en condiciones control. Sin embargo, en presencia de un estrés moderado (50 mM NaCl) la entrada del K^+ en células de la raíz estaba fuertemente inhibida en los mutantes pero no en las plantas silvestres. Ello era probablemente debido a que la despolarización de la membrana causada por tales concentraciones externas de Na^+ afectaban al transporte pasivo de K^+ a través de los canales AKT1, un canal de tipo KIR (Qi y Spalding 2004). Efectivamente, si se aumentaba la disponibilidad de K^+ en el medio se rescataba el fenotipo de crecimiento normal en plantas *sos1*.

A.2.1.2.2. SOS2

El gen *SOS2* (*CIPK24*), aislado por clonaje posicional de Arabidopsis, demostró ser imprescindible para la homeostasis de Na^+ y K^+ y la tolerancia al estrés salino (Liu et al. 2000). Este gen es uno de los 25 miembros que componen la subfamilia de serina-proteína quinasas en Arabidopsis, las denominadas SnRK3 (Hrabak et al. 2003), CIPK (*Calcineurin-Interacting protein kinase*) (Kolukisaoglu et al. 2004) o PKS (*Protein kinase SOS2-like*) (Gong et al. 2004), según la variable nomenclatura existente, que poseen una similitud estructural con la quinasa SNF1 (*sucrose non-fermenting*) de levaduras y con las quinasas dependientes de AMPc (*AMP-activated protein kinase*) de animales (**Fig. A10**).

En Arabidopsis, *SOS2* codifica a una serina/treonina proteína quinasa de 446 aminoácidos con un dominio catalítico en el extremo N-terminal, conservado en todas las CIPKs de tipo quinasa SNF1, y un dominio regulador en el extremo C-terminal, no presente en otras quinasas de tipo SNF1 (**Fig. A10**, Liu et al. 2000, Kolukisaoglu et al. 2004). Ambos dominios son esenciales para la función de *SOS2* en la tolerancia a la salinidad (Liu et al. 2000, Guo et al. 2004). Tanto en experimentos en levaduras como *in vitro* se ha demostrado que *SOS2* interactúa físicamente con *SOS3* (Halfter et al.

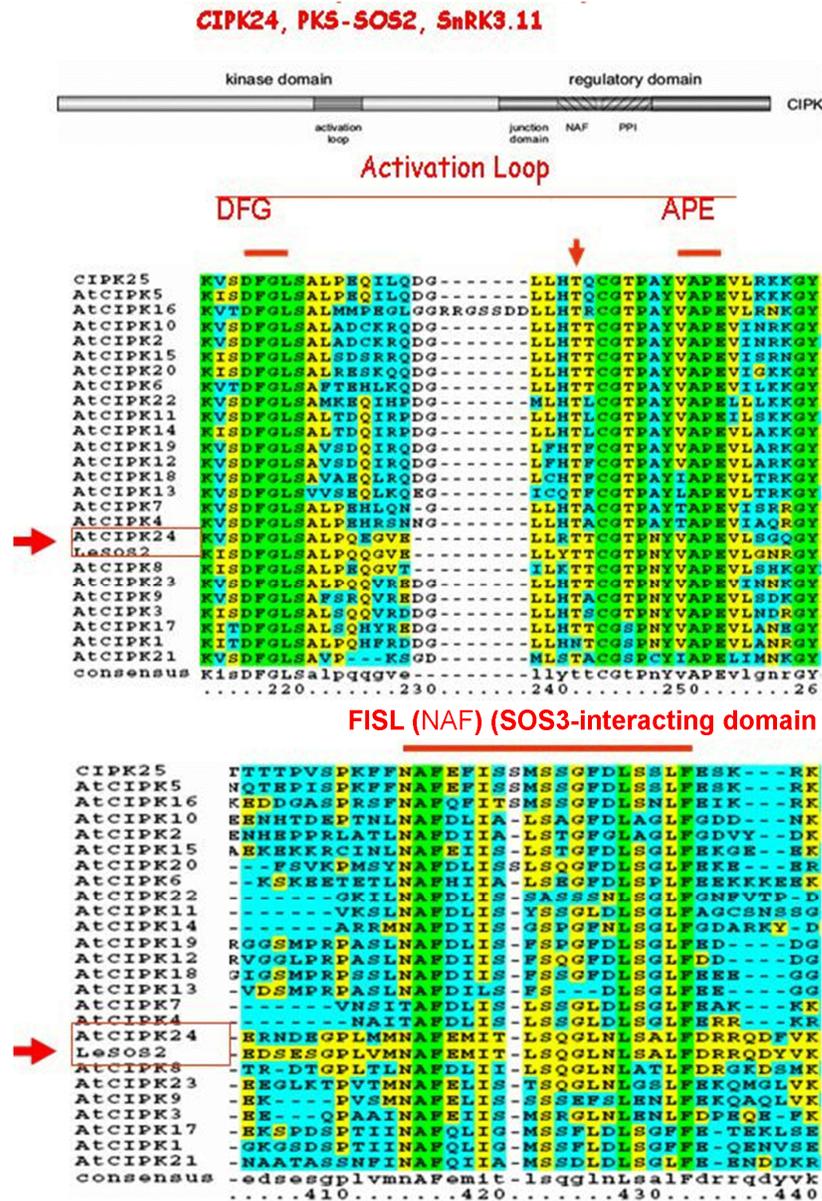
2000). El estrés salino induciría a través de un sensor o receptor de naturaleza desconocida, un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Knight et al. 1997), señal que sería detectada por la proteína codificada por SOS3 (Liu y Zhu 1998, Ishitani et al. 2000). La señal de calcio provoca un cambio conformacional en SOS3 que activa e interacciona físicamente con la serina/treonina proteína quinasa, SOS2 (**Figs. A7, A10 y A11**, Halfter et al. 2000). Los estudios realizados con los dobles mutantes *sos2 sos3* de Arabidopsis demostraron que los dos genes funcionaban en la misma ruta (Halfter et al. 2000).

A partir de estudios realizados con levaduras se demostró que un motivo de 21-aminoácidos en el dominio regulador del C-terminal (motivo FISL o NAF) de SOS2 es necesario y suficiente para su interacción con SOS3. La búsqueda y análisis de las secuencias de las proteínas pertenecientes a la familia CIPK reveló que este motivo está ampliamente conservado (**Fig. A10**). La naturaleza hidrofóbica de este dominio sugiere una interacción de tipo lipofílica entre CBLs y CIPKs, lo que es consistente con los datos de cristalización de SOS3 que indican que su dimerización en respuesta a la unión de Ca^{2+} resulta en la exposición de una zona hidrofóbica que sería la que podría interaccionar con SOS2, de manera que dicha interacción libera el dominio autoinhibitorio, permitiendo el acceso de la proteína sustrato al dominio quinasa, en este caso SOS1, y por tanto, su activación por fosforilación (**Fig. A11**, Guo et al. 2001, Guo et al. 2002, Gong et al. 2004, Sánchez-Barrena et al. 2005 y 2007).

Además, SOS2 exhibe un dominio PPI o dominio de interacción con fosfatasa localizado en el extremo C-terminal responsable de la interacción de ésta proteína con otras proteínas que intervienen en la respuesta a otros tipos de estrés como ABI2 (*Abscic acid-Insensitive 2*), de manera que dicha interacción previene la unión de SOS3 a SOS2 y la subsiguiente activación del complejo quinasa (**Figs. A11 y R6**, Ohta et al. 2003). Asimismo, el dominio PPI de SOS2 es bloqueado por SOS3, lo que asegura que las dos actividades opuestas, fosforilación y desfosforilación, no ocurran simultáneamente. (Sánchez-Barrena et al. 2007). Se ha obtenido una versión hiperactiva de SOS2 independiente de SOS3, mediante la mutación de la treonina-168 por aspartato en el bucle de activación del dominio quinasa de SOS2 y delección del extremo C terminal, que contiene el dominio FISL (**Figs. A10 y R6**, Guo et al. 2001, 2004). Recientemente se ha demostrado la interacción directa de SOS2 con la H^+ -ATPasa vacuolar, así como con los antiportadores de Na^+/H^+ , NHX1 y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, CAX1 lo que sugiere que SOS2 puede jugar un papel esencial en la tolerancia a la salinidad y

adaptación en respuesta el estrés salino (Fig. A8, Qiu et al 2004, Cheng et al 2004, Batelli et al 2007).

Figura A10. Estructura secundaria de SOS2 (CIPK24), y de la subfamilia de CIPKs, mostrando los dominios esenciales para su mecanismo de acción con un aspártico



como sitio catalítico en el dominio DPG, el bucle de activación, APE y los dominios NAF y PPI de interacción con SOS3 y ABI2, respectivamente. Se muestra la secuencia de SISOS2 (anteriormente LeSOS2) con fines comparativos.

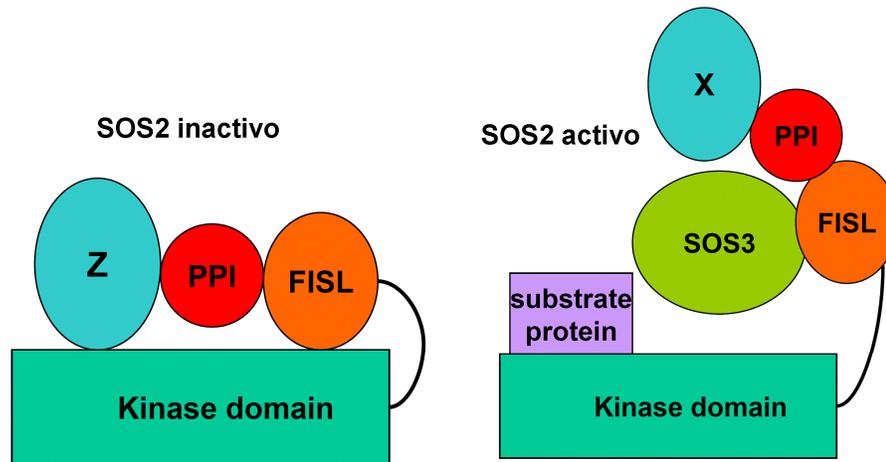


Figura A11. Esquema del mecanismo de acción de SOS2 tras su interacción con SOS3. Tomado de Gong et al (2004).

A.2.1.2.3. SOS3

SOS3 (CBL4) pertenece a una nueva subfamilia de proteínas de tipo *EF-hand* que ligan calcio, también conocidas por CBLs (*CalcineurinB-like*) o SCaBP (*SOS3-like Calcium Sensor Binding Protein*) (Gong et al. 2004; Kolukisaoglu et al. 2004), formada por 10 miembros en *Arabidopsis*, con cierta homología con la subunidad B de la calcineurina y con sensores de Ca^{2+} neuronales (NCS) (Liu y Zhu 1998, Guo et al. 2001).

La estructura de la proteína CBL es similar a la de CNB (unidad B de la calcineurina) y su cadena polipeptídica está plegada en dos dominios globulares, que están unidos por un pequeño dominio conector (Quan et al. 2007). Las proteínas CBL se caracterizan por poseer motivos de unión al Ca^{2+} conocidos como *EF-hands* (Nagae et al. 2003). Todas las CBLs de plantas poseen cuatro motivos *EF-hands* con diferentes grados de conservación con respecto a su secuencia canónica. El tamaño del dominio de unión entre los bucles *EF-hand* está absolutamente conservado en todas las proteínas y parece exclusivo de esta familia de sensores de calcio. El número así como el espaciamiento de los dominios *EF-hand* están absolutamente conservados en todas las isoformas conocidas de CBLs (Kolukisaoglu et al., 2004), lo que podría sugerir una estructura tridimensional común de todas las CBLs de plantas. Puesto que la estructura global de todas las AtCBLs está altamente conservada, la variación en el tamaño depende exclusivamente de la extensión o reducción de las regiones N y C-terminal.

Ciertos rasgos estructurales de las CBLs sugieren que estos sensores de calcio, pudieran funcionar en diferentes compartimentos subcelulares pudiendo cambiar su localización celular. Las CBLs sufren importantes modificaciones postraduccionales al unirse al ácido graso saturado miristato. La miristoilación tiene lugar en la glicina que sigue a la primera metionina de la secuencia diana localizada en el extremo N-terminal, MGXXXS/T T (**Figs. A12 y R9A**, Farazi et al. 2001). La miristoilación juega un papel crucial en la interacción proteína-proteína o en la unión de las proteínas a la membrana. De hecho, las proteínas miristoiladas están asociadas débilmente a la membrana y para incrementar la afinidad al ambiente lipídico de la membrana suelen sufrir una modificación post-traducciona que implica la unión de un grupo palmitoilo al residuo de cisteína adyacente a la glicina miristoilada, estabilizando así esta unión (Meinell et al 2005, **Fig. R9A**). Las secuencias N-terminales de AtCBL1, AtCBL4/SOS3, AtCBL5 y AtCBL9 albergan motivos conservados de miristoilación. En el caso de AtCBL4/SOS3 dicha modificación es un requisito indispensable para la tolerancia a la salinidad, puesto que la activación de SOS1 por el complejo SOS2/SOS3 requiere el reclutamiento de SOS2 a la membrana plasmática por el sensor SOS3, debidamente miristoilado (Ishitani et al., 2000; Quintero et al., 2002). Estudios recientes de localización han demostrado que también AtCBL1 y AtCBL9 se localizan en la membrana plasmática (Xu et al. 2006; Li et al. 2006; Cheong et al. 2003).

La mayoría, si no todos, de los mecanismos de transducción que regulan procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos en respuesta a diferentes señales endógenas y ambientales en plantas van acompañados por cambios de la concentración de calcio celular (Gilroy y Trewavas 2001). Cada señal de calcio particular tiene que ser expresamente descifrada. Diferencias sutiles de tales señales pueden contener las pistas primarias para la especificidad de respuesta. La unión de CBL/CIPK proporciona una combinación de 10 proteínas sensoras y 25 quinasas efectoras, donde factores como su expresión génica, localización subcelular, afinidad por el Ca^{2+} y especificidad de la interacción CBL/CIPK, juegan un papel esencial en esta decodificación de las señales características del Ca^{2+} citosólico (Luan 2009).

La combinación estudiada en mayor profundidad ha sido AtCBL4/SOS3-AtCIPK24/SOS2. La descripción de la estructura cristalina de AtSOS3/AtCBL4 por difracción de Rayos-X (Sanchez-Barrena et al 2005) y del complejo AtSOS3/AtSOS2 (Sanchez-Barrena et al 2007), ha permitido postular su mecanismo sensor del Ca^{2+} (**Fig. A12**).

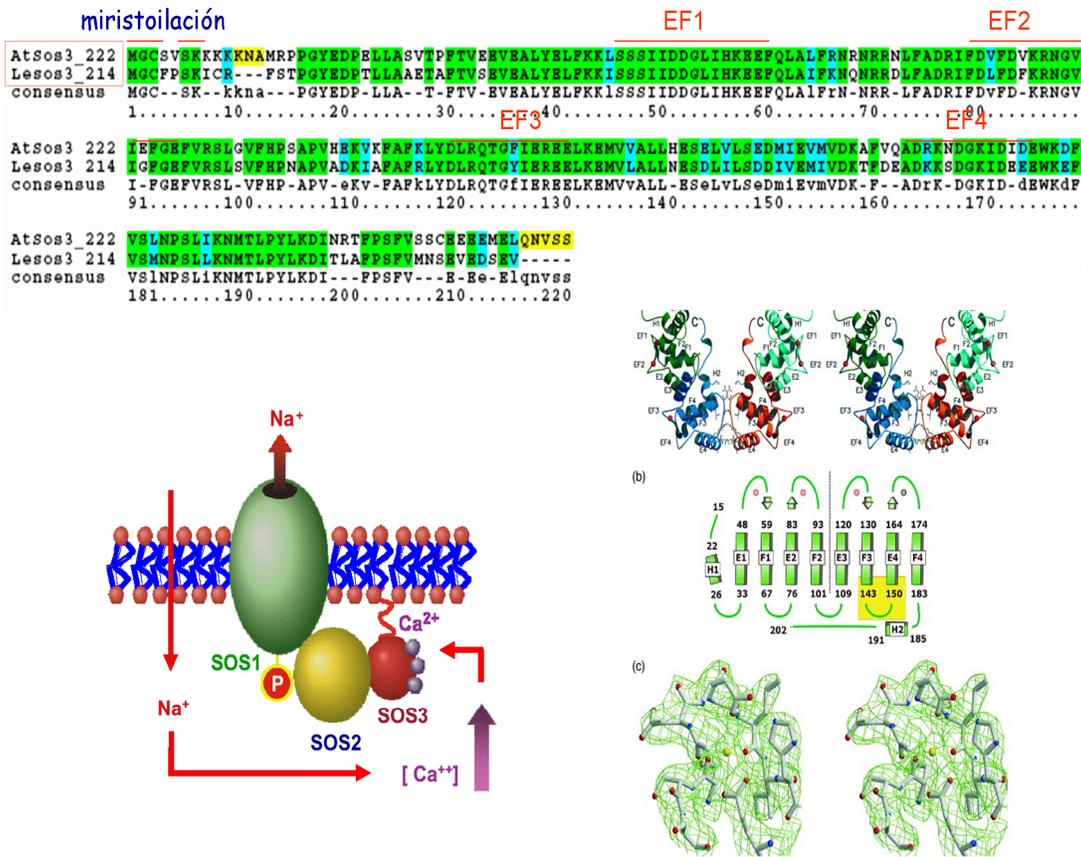


Figure A12. Estructura secundaria y mecanismo de acción de AtSOS3. Se muestran cada uno de los motivos EF-hand de unión a Ca^{2+} y el motivo miristoilado. La unión del Ca^{2+} promueve la dimerización de la proteína que expone motivos hidrofóbicos a través del cual interacciona con el motivo FISL de SOS3 para formar el complejo SOS2/SOS3, que fosforila a SOS1 (Sanchez-Barrrena et al. 2005). Se muestra la secuencia de SISOS3 (anteriormente LeSOS3) con fines comparativos.

Así, la unión de Ca^{2+} promueve la dimerización de SOS3, causando un cambio conformacional que incrementa su carácter hidrofóbico permitiendo su unión con el motivo FISL de SOS2. Esto unido a la miristoilación (y palmitoilación) de su extremo N-terminal dirige el complejo a las inmediaciones de SOS1 en la membrana plasmática, activándose por fosforilación su actividad de extrusión de Na^+ durante el estrés salino (Quintero et al. 2002, Qiu et al. 2002). Otra CBL que parece estar implicada en la tolerancia a la salinidad es la descrita de guisante, PsCBL (Mahajan, et al 2006). Recientemente, se ha descrito la AtCBL10 (SCABP8) como otro miembro de la familia de CBLs implicada en la regulación de la respuesta al estrés salino (Kim et al. 2007; Quan et al. 2007). Al contrario que CBL4/SOS3, CBL10 se expresa únicamente en

tejidos verdes y no en raíces. Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a la localización subcelular de esta proteína. Según Kim et al. (2007), la proteína AtCBL10 interacciona físicamente con AtCIPK24/SOS2, formando un complejo que se asociaría con los compartimentos vacuolares responsables del almacenamiento de sales y detoxificación de las células vegetales. Sin embargo, Quan et al. (2007) demuestran que esta proteína recluta SOS2 a la membrana activando así SOS1 para extruir Na^+ fuera de la célula.

A.2.2. Otros mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis celular

A.2.2.1. Producción de osmolitos

El estrés hídrico causado por el componente osmótico de la salinidad, y que es común a otros estreses, como sequía y frío (**Fig. A2**), conlleva la pérdida del turgor necesario para la expansión celular y a procesos destructivos irreparables en las proteínas y membranas celulares (Serrano y Gaxiola 1994). Aunque el uso de iones para ajuste osmótico puede ser energéticamente más favorable, las plantas glicófitas (y también halófitas) típicamente responden a la pérdida del turgor restableciendo el equilibrio osmótico mediante la síntesis y acumulación, principalmente en citosol, de osmolitos compatibles con la actividad de los enzimas, del tipo de los polioles (glicerol, sorbitol, manitol, pinitol), azúcares no reductores (fructano, trehalosa y sacarosa), ácidos orgánicos (ácido málico) y algunos aminoácidos y derivados (prolina y glicina-betaína) (Pilon-Smith et al. 1995, Bohnert y Jensen 1996, Hare et al. 1998, Zhu 2002, Munns 2005, Chinnusamy et al. 2005, Tuteja 2008).

Entre los osmolitos indicados, la prolina es el que más frecuentemente se acumula en condiciones de estrés osmótico, provocado principalmente por sequía y salinidad. La prolina sirve como un almacén de carbono y nitrógeno y secuestrador de radicales libres, estabilizando, además las estructuras de membrana y proteínas, así como tamponando el potencial redox bajo estrés (Delauney y Verma 1993). El papel de la prolina en la tolerancia al estrés osmótico se apoya en la mayor tolerancia al NaCl detectada en mutantes acumuladores de prolina obtenidos por mutagénesis química, variación somaclonal o ingeniería genética (Taylor 1996, Petrusa y Winicov 1997, Nanjo et al. 1999). Asimismo, la expresión del enzima responsable de la síntesis de prolina, la 1-pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS), está inducida por el estrés salino y osmótico en

plantas (Liu y Zhu 1997), habiéndose demostrado que la sobreexpresión de P5CS en tabaco conlleva un incremento en la concentración de prolina, al tiempo que determina una mayor productividad en condiciones de déficit hídrico (Kishor et al. 1995). No obstante, se ha constatado que en algunos casos su acumulación o su síntesis se inician cuando el daño celular es evidente, indicando que la síntesis de prolina no siempre constituye un marcador de tolerancia (Perez-Alfocea et al. 1994, Cano et al. 1996, Liu y Zhu 1997).

La glicina-betaína es otro de los osmolitos orgánicos que también se acumulan en algunas plantas en condiciones de estrés osmótico, actuando como osmoprotector estabilizando las membranas y las estructuras cuaternarias de proteínas (Bohnert y Jensen 1996). Se sintetiza en el estroma cloroplastidial por medio de la colina monooxigenasa y betaína-aldehído deshidrogenasa, siendo este último inducible por estrés osmótico, y clave en la tolerancia de maíz (Saneoka et al. 1995).

La sacarosa y/o los azúcares reductores solubles son otros solutos orgánicos involucrados en el ajuste (Pilon-Smith et al. 1995, Ishitani et al. 1996, Gao et al. 1998). Además de su papel como osmolitos, los azúcares pueden jugar otras funciones en plantas estresadas. Así, la acumulación de azúcares solubles en respuesta a la sal permite paliar el estrés oxidativo causado por la salinidad, debido a la capacidad de algunos de estos solutos para neutralizar los radicales hidroxilos (Hare et al. 1998). Además, los azúcares no solamente son importantes para el crecimiento de la planta, sino que también afectan a los sistemas sensores que regulan la expresión de una variedad de genes involucrados en la fotosíntesis, respiración, síntesis y degradación de almidón y sacarosa y metabolismo nitrogenado (Koch 1996).

En la revisión de Chinnusamy et al (2005), puede encontrarse un listado reciente de plantas transgénicas de diferentes especies con una producción incrementada de osmolitos compatibles que mejoran la tolerancia a los estreses hídrico y salino en condiciones experimentales de laboratorio, si bien, dicha mejora fue atribuida a su efecto como osmoprotectores, mas que a su contribución al ajuste osmótico. No obstante, la estrategia de incrementar la producción de osmolitos vía ingeniería genética en la mejora de la tolerancia mediante, se ha puesto en entredicho, ya que las concentraciones a las que se acumulan no son lo suficientemente altas como para explicar el ajuste osmótico, suponiendo además un alto coste energético para la planta, y que en ningún caso ha resultado en una mejora efectiva de la tolerancia en condiciones de campo o en condiciones reales de producción (Flowers 2004).

A.2.2.2. Producción de ROS

El estrés salino, como otros estreses abióticos (**Fig. A2**), produce la acumulación de ROS que es dañina para las células a altas concentraciones, ya que causa un daño oxidativo a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Chinnusamy et al. 2005). Las plantas poseen una variada gama de antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y enzimas del ciclo ascorbato-glutation) y no enzimáticos (p.e., ascorbato, glutatión, α -tocoferol y carotenoides) para combatir el estrés oxidativo (Vinocur y Altman 2005, Chinnusamy et al. 2005). La evidencia acumulada indica que la actividad y el nivel de expresión de genes que codifican a los enzimas antioxidantes incrementan en respuesta a ROS bajo condiciones de estrés abiótico, y específicamente salinidad. Puesto que no es objetivo de este trabajo, puede encontrarse de forma muy detallada en la excelente revisión llevada a cabo por Ashraf (2009), diferentes aspectos relativos a la formación de ROS en plantas en condiciones de estrés salino, su efecto en el crecimiento y metabolismo de las plantas, y la respuesta defensiva de las plantas frente a ROS, así como la utilización de los antioxidantes como marcadores y en la mejora de la tolerancia a través de la ingeniería genética. Asimismo, evidencias bioquímicas moleculares parecen indicar una conexión entre el estrés salino y el estrés oxidativo, a través de la implicación de la ruta SOS, algunas de las cuales ya han sido discutidos en el **apartado A.2.1.2.1**.

A.3. Idoneidad del tomate como modelo genético vegetal para estudiar la homeostasis iónica bajo condiciones salinas

De los antecedentes expuestos en este capítulo de esta memoria, especialmente los provenientes de la investigación en plantas modelo como *Arabidopsis* y arroz, ha conducido a la idea actualmente preponderante de que la homeostasis del K^+ a nivel de planta entera bajo condiciones salinas tiene lugar, al menos en una gran medida, por medio de la regulación de las concentraciones internas de Na^+ en los diferentes tejidos, a través de diferentes transportadores de Na^+ que controlan la carga y descarga xilemática, entre ellos, especialmente, los de tipo SOS1 y HKT (Zhu et al 1998, Horie y Schroeder 2004, Rus et al. 2005; Ren et al. 2005, Sunarpi et al. 2005, Apse y Blumwald 2007).

Como *Arabidopsis* es una planta glicófito y muy sensible a la salinidad, podría pensarse que no es apropiada para llevar a cabo el estudio de los mecanismos de tolerancia a la salinidad. Sin embargo, a través de procesos de adaptación, las glicófitas poseen la maquinaria para la tolerancia a la salinidad que no opera efectivamente en condiciones de no-adaptación. Así, la diferencia a la tolerancia a la salinidad entre glicófitas y halófitas resultaría ser más bien cuantitativa que cualitativa, y los mecanismos básicos de tolerancia a salinidad muy probablemente se encuentren conservados en todas las plantas. La identificación de *loci* sensibles al exceso de salinidad fue un descubrimiento de una importante ruta reguladora que controla la homeostasis iónica y la tolerancia salina (Zhu, 2002).

No obstante, existen dos importantes limitaciones en lo que se refiere al estudio del transporte de Na^+ a larga distancia en *Arabidopsis*. La primera es la práctica ausencia de tallo, o al menos, tan corto que no permite una disección precisa de los contenidos relativos de Na^+ en tallo con respecto a las hojas, lo que limita el estudio de importantes factores que controlan la homeostasis de Na^+ y K^+ a nivel de organismo bajo condiciones salinas, como son los procesos de reabsorción de Na^+ por el tallo y su redistribución en hojas viejas. (Tester y Davenport 2003). La segunda limitación es que en *Arabidopsis* y otras plantas modelo, como cebada, maíz o arroz no comparten un modelo similar de expresión, regulación y características cinéticas para muchos de estos transportadores (p.e., un miembro de HKT en *Arabidopsis*, 9 en arroz) (Mäser et al 2001, García-deblás et al. 2003, Møller y Tester 2007). Asimismo, las diferencias anatómicas y fisiológicas entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, y sus respuestas fisiológicas diferenciales a la sal, aconsejan para estas últimas, la utilización de un modelo vegetal diferente que permita estudiar las bases moleculares de la homeostasis de Na^+ y K^+ bajo condiciones salinas en especies hortícolas de interés agronómico (Tester y Bacic 2005, Davenport et al. 2005 y 2007, Møller y Tester 2007, Byrt y Munns 2008).

A este respecto, el tomate constituye un conveniente y excelente modelo de planta de cosecha que lo hacen idóneo para estudiar dichos aspectos (Foolad 2007): su gran relevancia económica nacional e internacional, haber sido objeto de amplios estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares, por ser fácilmente manipulable por ingeniería genética, así como por la existencia de una enorme cantidad de información disponible de los proyectos de secuenciación de ESTs a gran escala, estando en progreso la secuenciación de su genoma (*International Tomato Sequencing Project*

<http://www.sgn.cornell.edu>), que facilitará la identificación funcional de los genes de interés. Asimismo, el tomate presenta una gran diversidad genotípica en relación a la homeostasis iónica, habiéndose demostrado que el control del transporte a larga distancia durante el estrés salino constituye un importante determinante de su tolerancia a condiciones salinas, de forma que las más tolerantes acumulan mayor cantidad de sales en tallos y hojas, con una distribución diferencial en hojas viejas, que previenen su acumulación en hojas jóvenes, y las más sensibles lo hacen preferencialmente en raíces (Cuartero y Fernández-Muñoz 1999, Foolad 2004, Cuartero et al 2006). La raíz de tomate parece determinar, en una gran medida, las concentraciones de Na⁺ que llegan a la parte aérea en función de la intensidad del estrés (Estañ et al 2005), por lo que parece posible la implicación en dicha regulación del módulo funcional de SOS o de transportadores de tipo HKT en las células parenquimáticas que cargan al xilema de raíz y tallo.

Desde el punto de vista agronómico, el tomate es el cultivo hortícola de mayor importancia económica nacional y mundial, cultivado en zonas altamente productivas, que en España corresponde fundamentalmente a regiones áridas y semiáridas de la franja sureste mediterránea (Granada, Almería, Murcia y la región levantina). En estas zonas, fuertemente dependientes de la irrigación, se viene produciendo un fenómeno de salinización creciente de los suelos y del agua de riego que está afectando gravemente a la producción de estos cultivos, originado fundamentalmente por malas prácticas de riego y uso de aguas salobres, derivada de la gran demanda de agua de alta calidad para consumo humano e industrial (Cuartero y Fernández-Muñoz 1999). Para resolver este problema se han venido aplicando de forma complementaria estrategias tecnológicas y biológicas (Cuartero et al 2006). Las estrategias biológicas, de especial importancia en Agricultura Sostenible, persiguen la utilización del potencial genético de las variedades y especies relacionadas como objeto de selección y mejora, lo que requiere un conocimiento de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que controlan la tolerancia, que haga posible una mejor aplicación de los criterios de selección de genotipos, identificación de rasgos halofíticos y, eventualmente, su manipulación por cruzamiento convencional o por ingeniería genética.

En relación al cultivo del tomate, se han identificado fuentes de variación genotípica en ciertas variedades cultivadas primitivas y, particularmente, en algunas especies silvestres genéticamente próximas con un alto nivel de tolerancia a la sal, que pueden servir como donadores de rasgos de tolerancia. Algunas de estas especies silvestres,

Solanum pimpinellifolium o *S. cheesmanii* parecen cumplir estos requisitos, ya que soportan concentraciones de 150-200 mM NaCl, sin merma aparente en el crecimiento (Cuartero y Fernandez-Muñoz 1999). Estas especies de comportamiento halófito (*includoras*) puede diferenciarse de sus parientes sensibles de comportamiento glicófito (*excludoras*) en la utilización de unos pocos determinantes de tolerancia (transportadores de iones y/o síntesis de osmolitos) y sus correspondientes rutas reguladoras, o bien presentar variaciones en la expresión o la regulación de los mismos (p.e. alelos hipo o hiperactivos), lo que explicaría una mejor adaptación a la sal (Cuartero y Fernandez-Muñoz 1999, Cuartero et al. 2006). Sin embargo, la obtención de variedades tolerantes a la salinidad en términos de producción derivado de la aplicación de técnicas de mejora clásica de introgresión de caracteres de especies silvestres en variedades cultivadas ha tenido un éxito muy limitado o casi nulo, debido al escaso conocimiento de las claves biológicas (QTLs definidos) que caracterizan a los distintos genotipos que puedan utilizarse como rasgos de halotolerancia (Cuartero et al 2006). A ello se une la dificultad de combinar en el proceso de selección de este rasgo tan complejo, probablemente con un gran número de genes implicados, el rasgo del rendimiento y calidad de la cosecha (Flowers 2004, Foolad 2004).

La ingeniería genética constituye un método rápido para la mejora de plantas de interés agronómico. Aunque numerosos estudios han mostrado que la sobreexpresión de un único gen permite obtener plantas resistentes, incluido tomate, a concentraciones relativamente elevadas de sal (ver apartados previos), han surgido serias dudas de la efectividad de esta estrategia, para la obtención de cultivos tolerantes a la sal en condiciones reales de producción, debido precisamente al carácter multigénico de la tolerancia, y porque la introducción de genes claves en la halotolerancia también puede afectar a otros parámetros importantes de la producción (Flower 2004, Cuartero et al 2006, Foolad 2007, Yeo 2007).

No obstante, la aplicación de las herramientas de genómica funcional, para la identificación y análisis funcional de genes *in planta*, como la sobreexpresión y silenciamiento génico, son de gran utilidad no solo para descifrar los mecanismos implicados en procesos claves para la producción agrícola en condiciones de salinidad, sino también porque puede proveer de marcadores moleculares de halotolerancia, paso previo para la mejora genética. En relación a ello, un importante abordaje funcional alternativo que va a facilitar sin duda dicha mejora, es la investigación sobre el gen o grupo de genes implicados en la funcionalidad de QTLs que determinan rasgos de

halotolerancia, y, particularmente, sobre la asociación entre genes candidatos de funciones conocidas por abordajes anteriores de genética molecular con dichos QTLs (Asins 2002, Yamaguchi and Blumwald 2005, Salvi y Tuberosa 2007, Yeo 2007).

Todo ello permitirá incrementar la eficacia de los programas de mejora del tomate, en este caso, a condiciones salinas mediante la selección de genotipos, asistida por marcadores moleculares asociados a los rasgos de interés, o su utilización, ya sea como factores de halotolerancia, sea de mayor eficiencia en la nutrición de K^+ o del uso del agua, por introgresión de sus variantes alélicas favorables vía cruzamiento convencional, o por ingeniería genética, lo que repercutirá en la producción y en la calidad. Dado el actual rechazo social a las cosechas modificadas genéticamente, la primera estrategia podría ser más realística a corto o medio plazo que la segunda (Ashraf et al 2008).

A.4. Aplicación de herramientas de genómica funcional para la caracterización de genes implicados en la homeostasis iónica.

Silenciamiento génico postranscripcional

El silenciamiento génico mediado por ARN es un proceso de degradación de una secuencia específica conservado en casi todos los organismos y que se conoce como silenciamiento génico post-transcripcional (*postranscriptional gene silencing* –PTGS-), ARN de interferencia (RNAi) o *quelling*, en plantas, animales y hongos respectivamente. Este proceso que ocurre naturalmente ha sido reconocido como una importante herramienta en los estudios de genética reversa (Baulcombe 2002; Waterhouse y Helliwell 2003). A través de este mecanismo, la maquinaria celular impide la expresión de un gen que debería estar expresándose en circunstancias normales. La expresión génica se puede regular tanto a nivel transcripcional como postranscripcional.

El silenciamiento génico transcripcional (*Transcriptional Gene Silencing* o TGS) es el resultado de la modificación de las histonas. Esta modificación crea un ambiente de heterocromatina alrededor de un cierto gen, que impide el acceso de la maquinaria transcripcional (factores de transcripción, ARN polimerasas, etc.). El silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), en cambio, es un término que engloba una serie de eventos dirigidos a la degradación del mRNA con especificidad de secuencia y a la disminución de la expresión del gen correspondiente. En un principio TGS y PTGS se

consideraban dos rutas separadas e independientes, pero recientemente se ha demostrado que constituyen dos vías alternativas, aunque no excluyentes. Ambos tipos de silenciamiento génico pueden iniciarse por la misma ruta de degradación de RNA de doble cadena, aunque con cierta especificidad, esto es, el TGS se inicia a partir de RNA de doble cadena conteniendo copias de secuencias promotoras, mientras que el PTGS lo hace a partir de RNA de doble cadena que incluye ORFs (Fagard y Vaucheret, 2000).

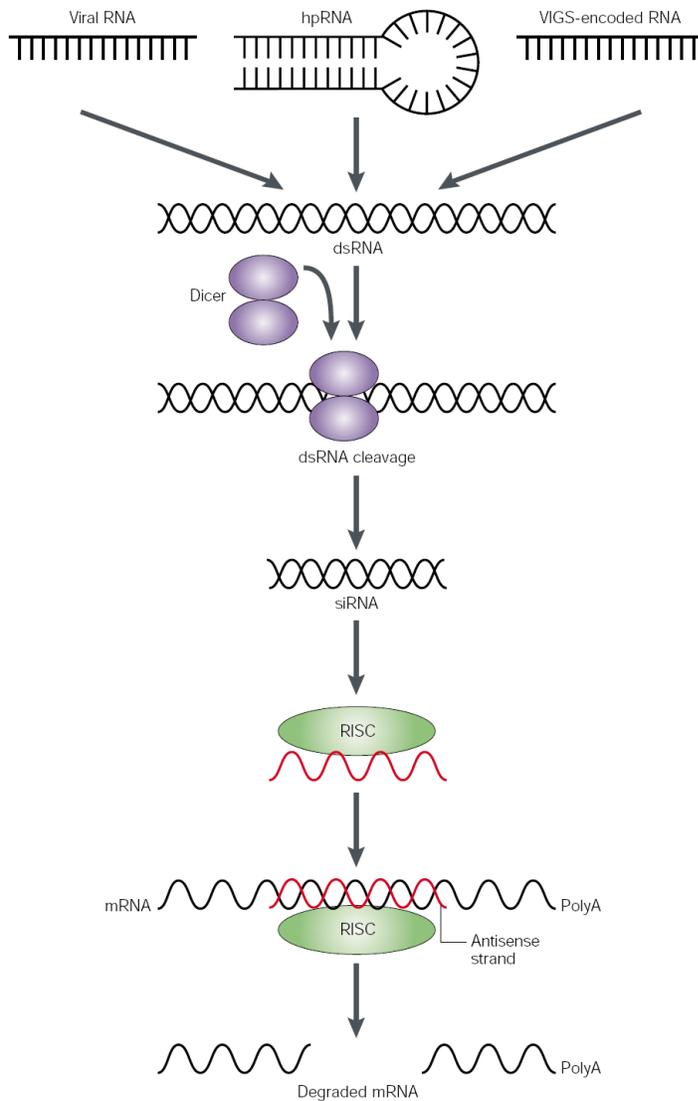


Figura A13. Presente modelo simplificado de silenciamiento génico mediado por ARN en plantas. ARNs de doble cadena (dsRNA), de virus ARN, de vectores derivados de virus (VIGS) o “hairpinRNA” (hpRNA) transcritos desde un transgen se procesan por un complejo enzimático DICER (ribonucleasa tipo III) para generar siRNA (“small interference RNA”). Un complejo que contiene una endonucleasa, RISC (“RNAi silencing complex”) es guiado por la hebra antisense del siRNA para romper ARNm específico complementario de la secuencia siRNA, promoviendo su completa degradación. Tomado de Waterhouse y Helliwell (2003).

A pesar de que el fenómeno de silenciamiento génico fue descrito por primera vez hace más de 15 años, aún no se conoce con precisión su mecanismo molecular. Sin embargo, se ha avanzado mucho en estudios que lo describen parcialmente. Utilizando análisis bioquímicos y genéticos se ha podido establecer un modelo que describe cómo se produce el PTGS. En este modelo, el silenciamiento puede dividirse en una etapa de iniciación y en otra etapa efectora y de mantenimiento (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hannon, 2002, Hutvágner y Zamore 2002, **Fig. A13**).

La etapa de iniciación comienza con la presencia de un ARN doble cadena (*double-stranded RNA* o dsRNA) (Fire et al. 1998). Este dsRNA puede ser un intermediario de replicación de un virus, puede haber sido introducido artificialmente o puede provenir de un transgén. El siguiente paso, la propagación del silenciamiento, se produce a nivel molecular, desde la secuencia diana inicial a otras adyacentes (silenciamiento transitivo), y a nivel de la planta completa, desde el punto donde se origina a otros tejidos (silenciamiento sistémico). El dsRNA es reconocido y es digerido por la enzima *Dicer*, que posee dominios de ARNasa tipo III (enzimas que degradan moléculas de ARN), para formar moléculas de ARN pequeñas (*small interference RNAs* o siRNAs) de 21-26 nucleótidos de longitud, también llamados *ARN guía* (Hamilton y Baulcome 1999, Voinnet et al. 2002).

En la etapa efectora, las moléculas de siRNA se asocian de manera específica a un complejo multienzimático, conocido como *RISC* (*RNA-induced silencing complex* - complejo de silenciamiento inducido por ARN-). La actividad helicasa de RISC separa las dos hebras del siRNA, y sólo una de ellas permanece unida al complejo. Una vez que RISC está activado, tiene como blanco la degradación de los ARN mensajeros homólogos a dichos *siRNAs*. En plantas existe además una etapa de amplificación que ocurre mediante la producción de copias del *dsRNA* que originó el silenciamiento, generando más moléculas de *siRNAs*; o directamente mediante la replicación de los *siRNAs*. En estos fenómenos interviene una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP, capaz de sintetizar moléculas de ARN empleando ARN como molde). Por otro lado, el silenciamiento desencadenado en un punto particular de la planta genera una señal móvil que es capaz de inducir el fenómeno en tejidos alejados del sitio de inicio. Si bien todavía no se conoce con exactitud la naturaleza de esta señal, existen pruebas contundentes que involucran a los *siRNAs* como participantes en este proceso (Palauqui et al. 1997; Voinnet et al. 1998).

Las investigaciones sobre las bases moleculares de PTGS en plantas han contribuido a la identificación de siRNA y los genes implicados en la ruta del silenciamiento génico mediado por ARN en eucariotas y más específicamente en plantas (Hamilton y Baulcombe 1999; Dalmay et al. 2000, Fagard et al. 2000).

Estos esfuerzos también han aportado evidencias de que el silenciamiento mediado por ARN juega un papel esencial en defensa contra el movimiento de elementos genéticos tales como virus y transposones (Vance y Vaucheret 2001, Waterhouse et al. 2001, Baulcombe 2002).

Por todo esto, el silenciamiento mediado por ARN ha sido considerado como una importante herramienta en genética reversa y sus aplicaciones han sido modificadas y mejoradas extensamente con objeto de facilitar la investigación de diferentes fenómenos en Biología Vegetal (Baulcombe 2002, Waterhouse y Helliwell 2003). La identificación de la ruta general para la inducción del silenciamiento génico en plantas condujo al desarrollo de varios métodos para llevar a cabo este silenciamiento mediado por ARN en plantas. En un principio se usaron construcciones antisentido que generaban RNAi y producían cosupresión génica, dando como resultado una modesta proporción de individuos silenciados, no más del 30% (Wesley et al. 2001). Recientemente se ha demostrado el potencial de construcciones hpRNA (*self-complementary hairpin*) compuestas por un promotor y un terminador entre los que se inserta una secuencia del gen diana inversamente repetida, de forma que el RNA transcrito hibrida consigo mismo formando una estructura en horquilla (Watson et al. 2005). Se ha comprobado que usando este tipo de construcciones con brazos sentido y antisentido de 98-853 nucleótidos, es posible silenciar genes en un gran número de especies vegetales. Además, se ha demostrado que la introducción de un intrón (*ihpRNA*), provoca un aumento en el efecto de silenciamiento hasta obtener casi el 100% de transformantes (Smith et al. 2000; Stoutjesdijk et al. 2002). Esta construcción da lugar, tras la transcripción, a una estructura compuesta por un “bucle” de RNA de cadena simple y un “tallo” formado por RNA de doble cadena con las repeticiones invertidas (**Figs. A13, A14 y M6**, Wesley 2001, Waterhouse y Helliwell 2003, Watson et al. 2005).

Mediante el uso de este tipo de construcciones *ihpRNA* se obtienen una serie de transformantes de los cuales algunos presentan una completa supresión (*knock-out*) del gen diana endógeno, y otros presentan niveles de actividad muy reducidos pero detectables. Esta variación en el grado de silenciamiento constituye una herramienta muy útil para estudios de funcionalidad génica, ya que la reducción de la expresión de

un gen causada por este tipo de construcciones puede producir plantas viables con fenotipos indicativos del papel de dicho gen (Wesley et al. 2001).

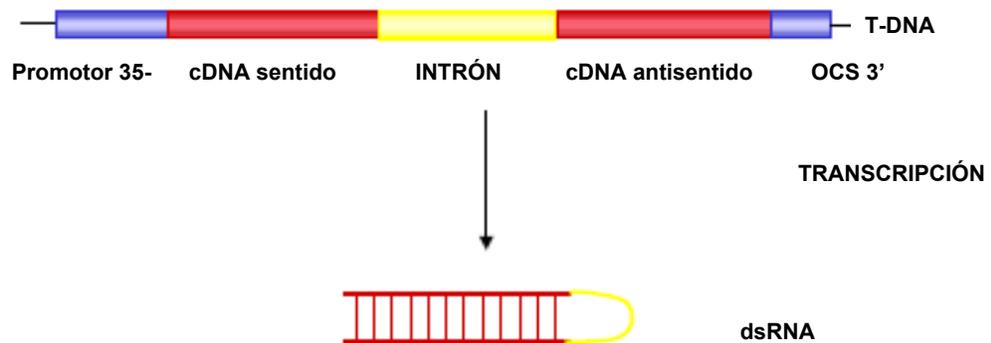


Figura A14. Esquema ilustrativo de una construcción *ihpRNA*

EL silenciamiento génico de un gen diana puede llevarse a cabo de forma estable por transformación genética de la planta mediada por *Agrobacterium*, a través de una construcción de ADN, que codifica alguno de los ARN anteriores, que se introduce en el T-DNA de *Agrobacterium*, produciendo un silenciamiento estable tras la transformación de la planta, ya en las líneas transformantes primarias, dado su carácter dominante, que es heredado en sucesivas generaciones (**apartado M7**). El uso de los vectores plasmídicos (pHANNIBAL/pKANNIBAL) han permitido la fácil fabricación de construcciones de tipo hpRNA usados en el presente trabajo (**Fig. M6**, Wesley et al. 2001).

Alternativamente, se ha desarrollado una técnica de silenciamiento génico transitorio especialmente útil para plantas difíciles de transformar establemente o para el estudio de genes esenciales en el desarrollo de la planta. Este tipo de silenciamiento transitorio consiste básicamente en el uso de un *Agrobacterium* transformado con un fragmento del genoma viral, que se introduce en la planta mediante infiltración y se conoce como VIGS (*virus-induced gene silencing* -silenciamiento génico mediado por virus-). El uso de los VIGS como vía de silenciamiento génico transitorio se basa en el hecho de que la ruta de silenciamiento mediada por siRNA en plantas constituye un mecanismo natural de defensa frente a virus DNA y RNA, hipótesis apoyada por el descubrimiento de que todos los virus de plantas codifican supresores del silenciamiento génico (Wang y Metzlaff 2005). VIGS es una técnica relativamente sencilla y rápida

que permitiría asignar funciones a genes que se han secuenciado pero de los que se desconoce su función, para lo cual se han diseñado multitud de vectores víricos. Lo esencial para llevar a cabo este proceso de silenciamiento es encontrar la combinación adecuada entre el virus y el hospedador. Es decir, encontrar un vector vírico que produzca síntomas suaves en la planta y silenciamiento en los meristemos, propagando la infección al mayor número de células y tejidos adyacentes al área infiltrada. La ausencia de vectores víricos que cumplan estas exigencias limita el uso de VIGS. Sin embargo, el desarrollo de vectores basados en TRV (*tobacco rattle virus*), que produce síntomas muy suaves e infecta sistémicamente los meristemos y los tejidos reproductivos han resuelto algunas de estas cuestiones. La mayor parte de los vectores disponibles son válidos para Solanáceas, y en particular, a *Nicotiana benthamiana* (Brigneti et al. 2004, Burch-Smith et al. 2004, Senthil-Kumar et al. 2007). La gran utilidad de esta técnica explica el que los últimos años más de 50 estudios independientes han descrito el desarrollo de vectores víricos para llevar a cabo VIGS en diferentes especies vegetales. Para detalles completos en cuanto a vectores disponible y la especie de planta en los que se puede usar, se sugiere la consulta de la revisión reciente de Senthil-Kumar et al. (2008).

IV. Plan de Trabajo

La investigación propuesta se ha concretado en el siguiente plan de trabajo:

1. Aislamiento de los genes homólogos *SOS* de tomate
2. Ensayo funcional de *SISOS* en levadura
3. Ensayo funcional in planta de *SISOS* en *Arabidopsis*
4. Genética reversa en tomate mediante silenciamiento génico de *SISOS1* (RNAi).
5. Evaluación del fenotipo de los transformantes con supresión de *SISOS1*.

V. Material y Métodos

M.1. Material biológico

M.1.1. Bacterias

M.1.1.1. Cepas bacterianas utilizadas

Escherichia coli

Para el clonaje y amplificación rutinaria de plásmidos, se ha utilizado la cepa *Novablue GigasinglesTM Competent Cells* (Bionova, Novagen) (*endA1 hsdR17 (rK12⁻ mK12⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proA⁺B⁺lacIqZΔM15::Tn10 (TcR)]*)

Agrobacterium tumefaciens.

Para la transformación de Arabidopsis y tomate se han utilizado las siguientes cepas de *Agrobacterium*:

Cepa	Selección cromosomal	Plásmido Ti	Selección	Planta	Referencia
LBA4404	Rifampicina	pAL4404 pSOUP	Estreptomicina Tetraciclina	Tomate	Hoeckema et al. (1983)
GV3101	Rifampicina	pMP90RK pSOUP	Gentamicina Kanamicina Tetraciclina	Arabidopsis	Koncz y Schell, (1986)

M.1.1.2. Medios y condiciones de crecimiento de bacterias

La esterilización de los medios se llevó a cabo autoclavando 20 min a 121°C y 1.8 atmósferas de presión.

Para el clonaje y propagación de plásmidos conteniendo el inserto completo de *SISOSI*, las bacterias crecieron en medio LB en el que el NaCl fue eliminado o sustituido por KCl.

Para el cultivo de las cepas de *Agrobacterium* se utilizó el medio LB o alternativamente el medio TYNG, para evitar la propensión de estas cepas a formar grumos.

Medio Luria-Bertani (LB)

Extracto de levadura	0.5 % (p/v)
Bcto-Triptona	1% (p/v)
NaCl	1% (p/v)

Medio TYNG

Triptona	10 g L ⁻¹
Extracto de levadura	5 g L ⁻¹
NaCl	10 g L ⁻¹
MgSO ₄	0.2 g L ⁻¹

Medio SOC

Bacto triptona	2% (p/v)
Bacto extracto de levadura	0.5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
glucosa	20 mM

Los cultivos bacterianos crecidos en medio sólido se llevaron a cabo adicionando a todos estos medios 15 g L⁻¹ de agar bacteriológico. Todos los medios se ajustaron a pH 7 con NaOH.

Antibióticos

Para la selección de plásmidos, se añadieron diferentes antibióticos (Duchefa), previamente esterilizados por filtración con filtros de 0.22 μm (Acrodisc, Pall Corporation), en el medio esterilizado y enfriado a $\sim 50^{\circ}\text{C}$.

- *Ampicilina*: solución madre preparada a una concentración de 10 mg mL^{-1} en agua de calidad milli-Q y utilizada a una concentración final de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

- *Kanamicina*: solución madre preparada a una concentración de 50 mg mL^{-1} en agua de calidad milli-Q y utilizada a una concentración final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

- *Rifampicina*: solución madre preparada a una concentración de 30 mg mL^{-1} en metanol (se conserva protegido de la luz) y usada a una concentración final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

- *Estreptomicina*: solución madre preparada a una concentración de 30 mg mL^{-1} en etanol absoluto y usado a una concentración final de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Los cultivos bacterianos que contenían los plásmidos de interés se conservaron a -80°C , previa adición de glicerol estéril a una concentración final del 15% (p/v).

M.1.1.3. Transformación de *E.coli*

Alícuotas de 50 μL de células competentes *Novablue GigasinglesTM Competent Cells* (Novagen) almacenadas a -80°C se descongelaron en hielo durante 5 min y se le añadieron entre 1-10 μL de producto de la ligación (0.1-0.2 μg de ADN plasmídico). Tras una incubación en hielo durante 5 min, las células se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 30 sec, manteniéndose durante 2 min en hielo. A continuación se añadieron 250 μL de medio SOC y se incubaron a 37°C en agitación durante 60 min. Las células se extendieron en placas de LB con el antibiótico de selección apropiado y se crecieron a 37°C durante 14-17 h. Los transformantes se confirmaron por PCR de colonias con los cebadores apropiados (**apartado M.3.7**) o bien mediante restricción enzimática de una mini preparación de ADN plasmídico del transformante (**apartado M.2.2**).

M.1.1.4. Transformación de *A.tumefaciens*

M.1.1.4.1. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*

Una colonia de *A. tumefaciens* de la estirpe apropiada se inoculó en 5ml de medio TYNG o LB con antibióticos de selección y se incubó hasta el día siguiente a 28° C con agitación orbital a 220 rpm. Con 0.5 mL de este precultivo, se inocularon 60 mL del mismo medio, incubándose a 28° C en agitación orbital a 220 rpm, hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0.5-0.6. Tras mantener el cultivo en hielo durante 10 min, se centrifugó a 4800 rpm (rotor GSA, Sorvall) durante 6 min a 4° C, y se resuspendió en 20 mL de 20 mM CaCl₂ frío, centrifugándose de nuevo para eliminar los restos de antibiótico. Las células se resuspendieron en 1 mL de 20 mM CaCl₂ frío y se congelaron y almacenaron a -80° C en alícuotas de 150 µl conteniendo 15 % (v/v) glicerol.

M.1.1.4.2. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*

A 150 µl de células competentes se añadió 10 µL de ADN plasmídico y se re congelaron en N₂ líquido durante 5min. Tras descongelarlas a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de medio TYNG o LB y se incubaron a 28°C con agitación suave durante 1 hora. Las células se recogieron por centrifugación y extendieron en placas Petri con TYNG o LB con los antibióticos de selección. Los transformantes se confirmaron por PCR de colonias (**apartado M.3.7.**) con los cebadores apropiados o bien recuperando el plásmido por retransformación de *E.coli* con una preparación del ADN plasmídico de *Agrobacterium* y analizando los transformantes bacterianos por restricción enzimática (**apartados M.2.2., M.1.1.3. y M.3.5.**).

M.1.2. Levaduras

M.1.2.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Se ha usado la estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* AXT3K ($\Delta ena1::HIS3::ena4$, $\Delta nha1::LEU2$, $\Delta nhx1::KanMX4$) construida por Quintero et al (2000) a partir de una cepa ANT3 ($\Delta ena1::HIS3::ena4$, $\Delta nha1::LEU2$), ambas derivadas de la estirpe silvestre W303-1B (*Mata ura3-1 leu2-3 112his3-11, 15trp1-1 ade2-1 can1-100*). Esta cepa es

auxótrofa para adenina, triptófano y uracilo y presenta un fenotipo de hipersensibilidad al NaCl, ya que carece de los principales sistemas de eflujo de Na⁺ necesarios para su tolerancia salina: las ATPasas de Na⁺ ENA1-4 y el antiportador Na⁺/H⁺, NHA1, localizados en la membrana plasmática, así como el antiportador Na⁺/H⁺, NHX1, situado en el retículo endoplásmico (Quintero et al. 2000 y sus referencias). Dicha cepa ha sido de gran utilidad en la caracterización funcional de proteínas transportadoras de Na⁺ procedentes de plantas. Se ha utilizado también la cepa YP890, derivada de la cepa AXT3K en la cual un *cassette* de expresión *PGK1:AtSOS1:CYCI* se insertó en la región cromosomal 3' no traducida del gen *CYCI* por recombinación homóloga (Guo et al., 2004). Ambas cepas han sido cedidas por los Drs. JM Pardo y FJ Quintero (IRNA-CSIC, Sevilla).

M.1.2.2. Medios y condiciones de crecimiento de levaduras

Las levaduras crecieron a 28-30C°. Para el crecimiento rutinario se usó el medio rico YPD

Medio YPD:

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

Para solidificar el medio se añadió 2% (p/v) de agar. Para el crecimiento de las levaduras en condiciones selectivas se usó el medio mínimo SD

Medio SD

Bacto-agar	2% (p/v)
Glucosa	2% (p/v)
Yeast nitrogen base sin amino ácidos (YNB)	0.7% (p/v)
Acido Succínico–Tris pH 5.5	50 mM

A este medio se le añadieron los aminoácidos a las concentraciones indicadas mas abajo requeridos por las distintas cepas auxótrofas utilizadas.

Adenina	1.74 mM
Uracilo	2.67 mM
Triptófano	0.48 mM

Para el crecimiento de las levaduras en medio mínimo en los experimentos de complementación funcional se utilizó el medio APD, descrito por Rodríguez-Navarro y Ramos (1984).

Medio APD

H ₃ PO ₄	8 mM
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0.2 mM
KCl	1 mM
Arginina	10 mM
Glucosa	2 % (p/v)
Elementos traza ¹	1ml
Vitaminas ²	1ml

¹Elementos traza:

BO ₃ H ₃	0.8 mM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.016 mM
KI	0.06 mM
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.07 mM
MnSO ₄ .H ₂ O	0.26 mM
Na ₂ MoO ₄	0.08 mM
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.14 mM

²Vitaminas

Biotina	0.80 μM
Niacina	0.32 μM
Piridoxina	0.19 μM
Tiamina	0.12 μM
Ca-Pantotenato	0.08 μM

El pH se ajustó a 6.5 con L-arginina hasta una concentración final de 10mM. Este medio carece de K⁺ y otros cationes alcalinos y contiene los aminoácidos necesarios para el crecimiento de las cepas en las concentraciones indicadas mas arriba. Para realizar ensayos de tolerancia salina de la levadura, se añadió 1mM de KCl y se suplementó con NaCl a diferentes concentraciones. Las cepas que portaban diferentes

construcciones plasmídicas se almacenaron a -80 C° después de añadir 15% de glicerol estéril a la suspensión de células en el medio de cultivo.

M.1.2.3. Transformación de levaduras

Se ha seguido el protocolo rápido para la preparación de células competentes descrito por Gietz y Woods (2002). Se preparó un cultivo inoculando la estirpe apropiada de levadura sobre una placa de YPD-agar y se incubó toda la noche a 30° C. Se rascaron unos 25 µL de células de la placa con un asa de siembra y se pusieron en 1mL de agua estéril, sedimentándose por centrifugación durante 5 seg. Alternativamente, la cepa puede ser inoculada en 5 mL de medio YPD e incubando a 30°C en agitación a 200 rpm toda la noche. En este caso, las células se recogieron por centrifugación durante 5 seg. Las células se resuspendieron en 1 mL de acetato de litio (LiAc) 100 mM, y se incubaron durante 5min a 30° C. Tras una centrifugación de 5 sec, el sedimento celular se resuspendió en 240 µL PEG3350 50% (p/v), 36 µL LiAc 1.0 M, 50 µl ADN de cadena simple de esperma de salmón (2.0 mg mL⁻¹), 5 µL ADN plasmídico (100 ng-5 mg), 20 µL H₂O milliQ. La suspensión celular se agitó vigorosamente durante 1 min, y se incubaron durante 20 min a 42° C. Las células se recogieron por centrifugación durante 10 sec y se resuspendieron en 300 µL de H₂O milliQ, y se extendieron en placas selectivas de medio SD conteniendo los aminoácidos auxótrofos para la cepa, excepto el del marcador, es decir, el aminoácido cuya síntesis es determinada por el gen presente en el plásmido transformante, incubándose a 28°C durante 2-4 días.

M.1.3. Material vegetal

M.1.3.1. *Solanum lycopersicum* L.

Para los experimentos de aislamiento de genes de la ruta SOS de tomate se han utilizado semillas de *S. lycopersicum* cv. Pera. Para el estudio del patrón de expresión de los genes en función de la diversidad genotípica mediante ensayos de *northern blot* se han utilizado semillas de *S. lycopersicum* de una variedad tolerante, Edkawy, y otra sensible,

Moneymaker, y también, de una especie silvestre tolerante a la sal, como *S. pimpinellifolium* Mill. Acc. PE-2 (Cuartero y Fernández-Muñoz 1999). Para los estudios de silenciamiento génico postranscripcional (RNAi), se utilizaron semillas de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker. Todas estas semillas han sido cedidas por el Dr. Jesús Cuartero, Estación Experimental de La Mayora, CSIC, Málaga.

M.1.3.1.1. Esterilización de semillas

Para el tomate, se ha seguido el método de esterilización en líquido por lo cual se sumergen las semillas en una solución de etanol al 70% durante 2 minutos para despegar la capa gelatinosa que cubre las semillas. Transcurrido este tiempo, se eliminó el etanol y se lavaron las semillas con agua. Posteriormente, se sumergieron en una solución de hipoclorito sódico comercial diluido al 5% durante 3 horas. Pasado este tiempo, las semillas se lavaron cuatro veces en agua destilada estéril. Finalmente se dejaron las semillas en agua estéril durante toda la noche a temperatura constante 25°C. Todos los pasos se realizaron en agitación suave constante. El largo tratamiento con lejía y la incubación durante toda la noche se realizaron para estimular una germinación lo más uniforme posible.

M.1.3.1.2. Cultivo de plantas de tomate en suelo

Las semillas estériles de tomate se germinaron en cajas de plástico que contenían arena de cuarzo estéril, durante 4 días en oscuridad y a 24°C. Transcurrido dicho periodo, se transfirieron a la cámara de cultivo bajo unas condiciones de temperatura de 24°C/18°C, día/noche, iluminación de 122 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una humedad relativa del 40-50%.

Tras 8 a 10 días de iniciado el proceso de germinación, las plántulas se transfirieron a semilleros que contenían turba hasta alcanzar un porte adecuado (4 hojas), pasándose entonces a macetas de 5 L con turba. Las plantas transferidas a macetas se cultivaron en invernadero, con un valor medio de irradiación luminosa de 890 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 10-15 horas, entre Septiembre y Mayo, y mantenidas a una temperatura y humedad relativa de 27/15°C y 40/55 %, día/noche, respectivamente, hasta la fructificación. El régimen de riego fue 2-3 veces por semana con una solución 1/4x de Hoagland (**Tabla M1**) (Hoagland y Arnon 1950):

Tabla M1. Solución nutritiva de para el riego de tomate

Macronutrientes	[mM]
NH ₄ H ₂ PO ₄	1
KNO ₃	6
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5
Micronutrientes	[μM]
H ₃ BO ₃	60
MnCl ₂ ·4H ₂ O	20
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·H ₂ O	1
Fe-EDTA	60

M.1.3.1.3. Cultivo de plantas de tomate en perlita

Para experimentos de expresión génica (*Northern blot*), se llevó a cabo cultivos de tomate en macetas con perlita. Las semillas de tomate se esterilizaron en superficie (**apartado M.1.3.1.1**), se sembraron en macetas que contenían perlita estéril, donde crecieron durante cinco semanas. Las plantas se cultivaron bajo condiciones de invernadero (**apartado M.1.3.1.2**), regándose cada dos días durante la primera semana con un dilución 1/10 de una solución nutritiva de Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950) (**apartado M.1.3.1.2**) y posteriormente, con una dilution 1/4 de la misma solución nutritiva, en las que permanecieron para luego aplicarles el tratamiento salino los últimos tres días con 0 y 225 mM NaCl.

M.1.3.1.4. Cultivo de plantas de tomate en hidropónico

Las semillas estériles de tomate se germinaron en cajas de plástico que contenían arena de cuarzo estéril durante dos días en oscuridad y a 24 °C. Las semillas germinadas se pasaron a, una cámara de cultivo en condiciones controladas de temperatura y humedad (como en M.1.3.1.2) donde se cultivaron hasta que las plántulas alcanzaron un tamaño adecuado para el cultivo hidropónico (4 hojas), regándose durante una semana con una dilución 1/10 de la solución nutritiva de Hoagland modificada (**Tabla M2**) y durante otra semana con una dilución 1/4 de la misma solución nutritiva. A continuación las plántulas se transfirieron a cubetas de 2.5 L a razón de 4-6 plantas/cubeta, y se cultivaron en sistema hidropónico provisto de aireación durante 15 días en una dilución 1/4 de solución nutritiva, que se renovó cada tres días a fin de evitar contaminaciones. A los 10 días del inicio del cultivo hidropónico se procedió al tratamiento salino añadiendo a nueva solución nutritiva 1/4x, 0 y 100 mM NaCl.

Tabla M2. Solución nutritiva estándar para cultivo hidropónico de tomate

Macronutrientes	[mM]
KH ₂ PO ₄	1
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4
MgSO ₄ .7 H ₂ O	1
Mg(NO ₃) ₂ .6 H ₂ O	1
KNO ₃	5
Micronutrientes	[μM]
H ₃ BO ₃	46
MnSO ₄ . H ₂ O	10
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.8
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	5x10 ⁻²
ZnSO ₄ .5H ₂ O	3
EDTA-Fe	90

M.1.3.1.5. Cultivo de tomate in vitro

Este tipo de cultivo se llevó a cabo para la obtención de explantos de cotiledones de tomate para la transformación con *Agrobacterium*, así como para la germinación y selección de las líneas transformantes de tomate.

La manipulación del tejido vegetal en condiciones estériles se realizó en una cabina de flujo laminar. Los medios se esterilizaron mediante autoclave a 121 °C y 1.8 atmósferas de presión durante 20 min. El resto del material usado se esterilizó por calor en horno a 180°C durante 4 horas. Una vez esterilizadas, las semillas de tomate se transfirieron a tubos de ensayo que contenían medio de germinación (MS) (Duchefa), compuesto por los Macro y Micronutrientes inorgánicos del medio de Murashige y Skoog (1962), incluyendo vitaminas tamponado con MES (sigma) 0.5 g L⁻¹ (p/v) suplementado con sacarosa al 1% (p/v) y agar al 0.8 % (p/v), pH 6.2. Después de 2-4 días en oscuridad a 24°C, las plántulas se pasaron a una cámara de cultivo, donde crecieron a 24°C/18°C, día/noche, iluminación de 122 μE m⁻²s⁻¹ y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

En los experimentos de transformación de tomate, el medio selectivo de las líneas transformantes de tomate incluyó kanamicina a una concentración final de 300 μg mL⁻¹, en la solución nutritiva MS con agar, esterilizada y enfriada a ~50°C.

M.2. Purificación y análisis de ADN plasmídico

En líneas generales se siguieron los protocolos descritos por Sambrook et al. (1989), y en su caso, los descritos por el fabricante de los *kits* que han sido utilizados en el presente trabajo.

M.2.1. Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo, no construidos durante la realización del mismo se relacionan en la tabla siguiente.

Tabla M3. *Plásmidos utilizados*

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T easy	Vector para clonaje de rutina de fragmentos de ADN, con marcador Amp ^R	Promega
pYPGE15	Vector de expresión de <i>SISOS1</i> en levadura	Brunelli y Pall (1993)

	bajo el promotor <i>PGK1</i> , con marcadores <i>URA</i> , Amp^R	
p414GPD	Vector de expresión de <i>SISOS2</i> en levadura bajo control del promotor <i>GPD</i> , con marcador <i>TRP1</i> , Amp^R	Mumberg et al (1995)
pDR195	Vector de expresión de <i>SISOS3</i> en levadura bajo el promotor <i>PMA1</i> , con marcador <i>URA</i> Amp^R	Rentsch et al 1995
pKANNIBAL	Vector para generar la construcción de silenciamiento génico estable de <i>SISOS1</i> (<i>ihpRNA</i>). Marcador Kan^R	Wesley et al (2001)
pART27	Vector binario para la expresión de la construcción de silenciamiento mediada por <i>Agrobacterium</i> en plantas, con marcador <i>espec/estrep</i> ^R	Gleave (1992)
pCAMBIA1303	Vector binario para la sobreexpresión de genes en plantas mediada por <i>Agrobacterium</i>	Roberts et al (1997)
pSOS1-1	Vector pYPGE15 de levadura conteniendo el ORF de <i>AtSOS1-1</i> bajo control del promotor <i>PGK1</i> , con marcador <i>URA</i>	Shi et al (2002)
pSOS2T/DΔ308	Vector p414GPD de levadura para la expresión de <i>AtSOS2T/DΔ308</i> bajo control del promotor <i>GPD</i> , con marcador <i>TRP1</i> , Amp^R . Esta es una versión hiperactiva de <i>AtSOS2</i> independiente de <i>AtSOS3</i>	Guo et al (2001)
pFL32T	Vector pFL38 de levadura conteniendo los ORFs de <i>AtSOS2</i> y <i>AtSOS3</i> bajo control del promotor <i>ADH1</i> con marcador <i>TRP1</i>	Shi et al 2002

Los plásmidos pYPGE15, p414GPD, pDR195, pSOS1-1, pSOS2T/DΔ308 y pFL32T fueron cedidos por los Drs Jose Manuel Pardo y Francisco Javier Quintero, (IRNA-CSIC, Sevilla).

M.2.2. Minipreparaciones de ADN plasmídico

La preparación de plásmidos amplificados en *E. coli* se llevó a cabo mediante el kit comercial *Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich Química, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

M.2.3. Cuantificación de ADN plasmídico

La concentración de ADN en solución se estimó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies). Este se basa en la tecnología de retención de muestra que permite entre otra ventaja la utilización de 1-2 μ l de muestra sin necesidad de diluirla. La relación DO_{260}/DO_{280} se usó para estimar la contaminación de

la preparación por proteínas o polisacáridos. Alternativamente, la concentración de ADN se estimó por análisis de imagen de las bandas de ADN separadas por electroforesis en gel de agarosa como se describe en el **apartado M.2.4.**

M.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se ha realizado según se describe en Sambrook et al. (1989). El ADN plasmídico, el procedente de digestiones con enzimas de restricción y de reacciones de PCR se analizó en geles horizontales de agarosa al 0.7-1% (p/v), conteniendo bromuro de etidio, en tampones comerciales (ApplyChem, Alemania) de TBE 0.5x (45 mM Tris, 1.25 mM EDTA-Na₂, 45 mM H₃BO₃, pH 8.2) para comprobaciones rutinarias o TAE 1x (40 mM Tris pH7.6, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA) para la purificación de fragmentos. El tamaño de los fragmentos de interés se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de ADN comercial (*1Kb DNA ladder Molecular Weight Marker*, Genecraft). La cuantificación de los fragmentos de ADN en gel se hizo por comparación visual al ultravioleta en Analizador de imagen (BioRad) con una cantidad conocida de fago λ digerido con *EcoRI-HindIII (Molecular Weight Marker III*, Roche Diagnostic).

La recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se llevó a cabo con el kit comercial *GenEluteTM Gel extraction kit* (Sigma-Aldrich Química, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. La visualización del ADN en los geles de agarosa se realizó con ayuda del analizador de imagen Gel Doc 2000 (Bio-Rad Molecular Imagen System).

M.3. Purificación y análisis de ADN de plantas

M.3.1. Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico de plantas se utilizó el *kit* comercial *GenEluteTM Plant Genomic DNA Miniprep kit* (Sigma-Aldrich Química, España), siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 1-2 hojas (75-100 mg) de plantas jóvenes de tomate.

En los experimentos de análisis *Southern* para la investigación del número de copias del gen *SISOS1* en el genoma de tomate, que requería mayores cantidades de ADN genómico, la extracción se llevó a cabo por el procedimiento descrito por Edwards et al.

(1991). Aproximadamente, 0.5 gr de hojas se homogenizaron con mortero y pistilo en N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. El homogenado se transfirió a un tubo eppendorf, y se adicionaron 0.5 mL de tampón de extracción (0.8% -p/v- CTAB (*hexadecyltrimethylammonium bromide*), 140 mM sorbitol, 220 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.8 M NaCl, 22 mM EDTA y 1% -p/v- N-laurilsarcosina), precalentado a 65 °C y 0.5 mL de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v), con enérgica agitación en vortex. La mezcla se centrifugó 5 min a 16000 g, transfiriéndose el sobrenadante a un nuevo eppendorf, tras lo cual se añadió 1 volumen de isopropanol frío suplementado con 50 µL de acetato sódico 3M, que se agitó por inversión, incubándose a -20 °C durante 1 hora. La suspensión se centrifugó 10 min a 16000 g, desechándose el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0.5 mL de etanol frío al 70 % (v/v). Tras centrifugar 5 min a 16000 g, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó en campana extractora durante 15 min. El sedimento conteniendo el ADN genómico de hoja de tomate, se resuspendió en agua milliQ suplementada con RNAsa (0.1 mg mL⁻¹), conservándose a -80 °C.

Para determinar la concentración del ADN extraído, se siguió el método espectrofotométrico descrito en Sambrook et al. (1989), determinando la absorbancia a 260 y 280 nm de las soluciones acuosas conteniendo el ADN de las hojas de tomate. La relación A₂₆₀/A₂₈₀ se usó para estimar la contaminación de la preparación por proteínas o polisacáridos. Alternativamente, la concentración de ADN en solución también se estimó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies).

M.3.2. Análisis *Southern* del ADN genómico de tomate

M.3.2.1. Electroforesis de ADN y transferencia a membranas de nylon (*Southern blot*)

La separación electroforética se llevó a cabo para cada muestra de ADN genómico antes y después de ser digerido con diferentes enzimas de restricción. La digestión del ADN se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones del proveedor (Roche Diagnostics), como se describe en el **apartado M.3.5**. Se utilizaron 15 µg de ADN y se digirió con 10 U de enzima de restricción en un volumen total de 20 µL, durante 2 horas a 37°C,

tras lo cual se añadieron otras 10 U del mismo enzima, manteniéndose otras 12-16 h a la misma T^a para forzar al máximo la digestión.

La separación del ADN se realizó en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) en TBE 0.5x como se describe en el **apartado M.2.4**. Como solución de carga se utilizó sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0.25 %, en agua milliQ. Tras la separación electroforética a 15 V durante 12 horas, el ADN se visualizó bajo luz UV (260 nm) en un transiluminador, frente a marcadores de ADN de concentración conocida (*Molecular Weight Marker III*, Roche Diagnostic). La visualización del ADN en los geles de agarosa se realizó con ayuda del analizador de imagen Gel Doc 2000 (Bio-Rad Molecular Imagen System).

Previo a la transferencia a membranas de nylon, el ADN genómico se efectuó una despurinación ácida del ADN, sumergiendo el gel en 0.25 N HCl durante aproximadamente 10 min, hasta viraje del azul de bromofenol a amarillo y se repitió este paso una vez más. Seguidamente se lavó con agua destilada y se realizó la desnaturalización alcalina del ADN, sumergiendo el gel durante 15 min en 0.5 N NaOH conteniendo 1.5 M NaCl. Se repitió este paso una vez más hasta recuperar el color azul del bromofenol y se volvió a lavar el gel con agua destilada. Posteriormente, se introdujo el gel durante 20 min en 0.5 M Tris-HCl pH 7.4 suplementado con 1.5 M NaCl y se lavó con agua destilada.

El sistema de transferencia se describe en la **Figura M1**. Se preparó una membrana de nylon (*HybondTM N⁺*, 0.2 µm de poro, Amersham, Pharmacia Biotech) del mismo tamaño que el gel, sumergiéndose en agua destilada y después durante 5 min en tampón SSC 20x (3M NaCl y 0.3M citrato sódico, pH 7). Se recortaron también dos piezas de papel Whatmann 3MM del mismo tamaño y otra de mayor tamaño que el gel, y se saturaron en tampón SSC 10x. Sobre una superficie regular, habitualmente un cristal, se construyó una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por una pieza de papel Whatmann 3MM, cuyos extremos, a modo de mecha se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia SSC 10x; el gel; la membrana de nylon y dos piezas de papel Whatmann 3MM. Se colocó un marco de plástico que bordeó todo el sistema y, a continuación, se cubrió con papel absorbente. Sobre el conjunto se colocó una placa de vidrio y, sobre ésta, un peso de aproximadamente 1 Kg para mantener el sistema ligeramente comprimido. Se comprobó que el sistema estaba perfectamente horizontal, y se mantuvo la transferencia toda la noche.

Al día siguiente se lavó la membrana de nylon con 2x SSC durante 5 min y se fijó el ADN mediante calentamiento a 120 °C en condiciones de vacío, durante 30 min. Las membranas se guardaron al vacío a 4°C hasta su uso.

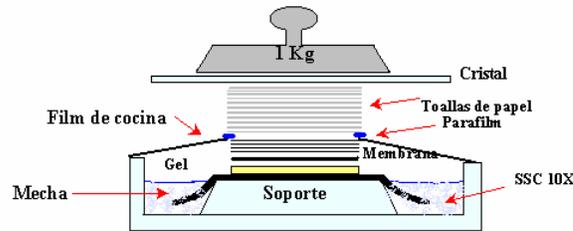


Figura M1. Esquema de la unidad de transferencia empleada en los experimentos de Southern blot.

M.3.2.2. Hibridación del ADN con sondas radiactivas

Como sonda se utilizó un fragmento de 300 pb de la zona C-terminal del gen *SISOS1*, obtenido por PCR, utilizando los cebadores S1CF y S1RSal2 (**Tabla M4**), una vez comprobado mediante PCR que dicho fragmento no abarcaba ningún intrón en la secuencia genómica. Este fragmento se diluyó en TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) a una concentración de 40 ng en un volumen de 45 µL. Posteriormente, se desnaturalizó por calor (95-100°C) durante 5 min y se conservó en hielo para evitar su renaturalización.

Las sondas de ADNc se marcaron con 5 µL de α -³²P dCTP (3000 Ci mmol⁻¹) por el método del cebamiento al azar (*random priming*) (Sambrook et al. 1989), utilizando el kit comercial *RediprimeTM II* (Amersham Pharmacia Biotech), que contenía dATP, dGTP, dTTP y el fragmento Klenow de la enzima ADN polimerasa I de *E. coli* siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se incubó 45 minutos a 37 °C y transcurrido este tiempo se adicionó 5 µL de 0.2 M EDTA para detener la reacción. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, los fragmentos marcados con ³²P se purificaron por centrifugación en *Mini Quick SpinTM columns* (Roche Diagnostics) que contenía Sephadex G-50, en tampón STE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El filtrado con la sonda marcada se recogió y se volvió a desnaturalizar por calor (95-100°C) durante 5 min, conservándose la sonda en hielo para evitar su renaturalización.

La hibridación se llevó a cabo por el método del PSE (Church y Gilbert 1984), consistente en la prehibridación a 55°C con 0.3 mL cm⁻² con medio PSE que contenía 7 % (p/v) SDS, 0.3 M fosfato sódico, pH 7.2 y 1 mM EDTA, durante al menos 1 hora. Tras eliminar la solución de PSE de la prehibridación, la hibridación, se llevó a cabo incubando la membrana de nylon con 30 µL cm⁻² de medio PSE que contenía la sonda previamente marcada y desnaturalizada, durante 16-24 h a 55°C.

Finalmente, se realizaron 4 lavados (50 mL/filtro) de 15 min en las siguientes condiciones: un lavado en 4x SSC + 0.1 % (p/v) SDS a 55 °C, un segundo lavado en 4x SSC + 0.1 % (p/v) SDS a 60°C, un tercer lavado en 0.4x SSC + 0.1 % (p/v) SDS a 62.5°C y un último lavado en 0.4x SSC + 0.1 % (p/v) SDS a 65 °C.

Cada membrana se envolvió con papel transparente de plástico y se introdujo en un casete de autorradiografía conteniendo una pantalla de *Phosphorimager* (BAS IP-MS 20 x 40 S, Fujifilm) y las señales de hibridación se registraron en un analizador de *Phosphorimager* (Bio-Rad Molecular Imagen System).

M.3.3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR

M.3.3.1. Oligonucleótidos cebadores

Todos los cebadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados y purificados por filtración en gel por la compañía TIB-MOL.BIOL, Berlín, subsidiaria de Roche Diagnostics S.L. Applied Science). En la **Tabla M4** se recogen las secuencias de todos los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la reacciones de PCR, RT-PCR y de secuenciación realizadas.

Tabla M4. Oligonucleótidos cebadores empleados en este trabajo en la reacciones de PCR y de secuenciación. D, directo; R, reverso; sec, secuenciación.

Oligos de SISOS 1	Dirección Restricción	Amplificación/ utilidad	Secuencia 5'-3'
DAB2p	D	Degenerado. Clonaje	5'-gc(a/t)tgcat(g/c)a(g/c)tt(c/t)tggaatg-3
RDAB6	R	Degenerado. Clonaje	
GSP2-239	D	RACE 3'	5'-gtctggacagcat(a/c)(a/g)tgaagatg-3'
GSP1-604	R	RACE 5	5'-ggtgctgtagcgtgtgtcccttcattg-3'
S1F1	D	Clonaje pGEM-T	5'-tccagatgaggtatgaggatgcactgg-3'
S1R1	R	Clonaje pGEM-T	5'-ccattgaattattgtttgtgaag-3'
S1FXba2	D, <i>XbaI</i>	Clonaje pYPGE15	5'-gaaaggctcagctgcctatg-3'
S1RSal2	R, <i>SalI</i>	Clonaje pYPGE15	5'-ggtctagattgaattattgtttgtgaag-3'
S1FEH	D	Oligo interno	5'-gggtcgacagattcataatcacag-3'
S1REH	R	Oligo interno	5'-agcttgcacactctctggg-3'
S1FH1	D	Oligo interno	5'-cgtgcatcctctcctcttc-3'
S1RH2	R	Oligo interno	5'-acgtagtatcgcatgagccc-3'
3F2.5b	D	Oligo interno	5'-tgctctgtgttgaggac-3'
3F2.5	D	Oligo interno	5'-gagaactctggtgcagaaagg'-3
3R2.5b	R	Oligo interno	5'-tatctgtctggattctccg'-3
5R2-1.7	R	Oligo interno	5'-cagttcgtccacatcctgtc-3'
5R1.7	R	Oligo interno	5'-tactgcacacctcttatctgg-3'
S1NF	D	5'-UTR	5'-ccccagacaagaataaaagcc-3'
S1NR	R	Oligo interno	5'-actttccccatctcacct-3
S1CF	D	Oligo interno	5'-acggataccatcgccaattc-3'
S1CR	R	Oligo interno	5'-ttcctggaattagtacagcca-3'
S1BXFi	D, <i>BamHI</i> , <i>XhoI</i>	Clonaje pKannibal,	5'-ggaataaaaatttgagacca-3'
S1HERi	R, <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i>	RNAi	5'-
FS1Nco2	D, <i>NcoI</i>	Clonaje pKannibal,	cgcgatcctcgagcaaaggcaactagagttggc-
RS1Bst2	R, <i>BstII</i>	RNAi	3'
		Clonaje en pCAMBIA	5'-
		Clonaje en pCAMBIA	cgacaagctgaattcgagctgaagaagcccttc-
			3'
			5'-atctgcatggcaataatggagttgtagtag-3'
			5'-aaaatgggttacctcagctgcctatgatgtt-3'
Oligos de SISOS 2	Dirección Restricción	Amplificación/ utilidad	Secuencia 5'-3'
S2F	D	Clonaje pGEM-T	5'-attgcttcttgattccaagg-3'
S2R	R	Clonaje pGEM-T	5'-tcgaaccgtctcattacaacc-3'
S2Feco	D, <i>EcoRI</i>	Clonaje p414-GPD	5'-cggaaatcgatgaagaagtgagag
S2Reco	R, <i>EcoRI</i>	Clonaje p414GPD	5'-gcgaatcggtcagcagatcctgtcc-3'
S2CF	D	Oligo interno	5'-tggataaaaacgagacccttg-3'
S2CR	R	3'-UTR	5'-aaaccgatattattgggatgg-3'
FS2Bgl	D, <i>BglII</i>	Clonaje en pCAMBIA	5'-ccgaagatctgtgatgaagaagtgagag-3'
RS2Bbr	R, <i>Bbr (PmlI)</i>	Clonaje en pCAMBIA	5'-aattcacgtgtcagcagctcctgtcct-3'
Oligos de SISOS	Dirección Restricción	Amplificación/ utilidad	Secuencia 5'-3'

3			
Oligos de vectores /genes control/RACE	Dirección Restricción	Amplificación/ utilidad	Secuencia 5'-3'
Rac5-S3R 5S3-R1 S3F1 S3R1 S3FXho S3FNot S3CF FS3Nco RS3Bbr	R R D R D, <i>Xho I</i> R, <i>Not I</i> D D, <i>NcoI</i> R, <i>Bbr (PmlI)</i>	RACE 5' Oligo interno Clonaje pGEM-T Clonaje pGEM-T Clonaje pDR195 Clonaje pDR195 Oligo interno Clonaje en pCAMBIA Clonaje en pCAMBIA	5'-agcagcgccaaaaccatctctttcagc-3' 5'-aaatccaatcactccgttg-3' 5'-atgtcctggaggctgttgacg-3' 5'-tttctgcatcaatctgggtagc-3' 5'-tgtactcgagtgtgggctgcttccct-3' 5'-atctggggcgcagctagactccgaatc-3' 5'-agcagataaaaagagtgacggg-3' 5'-tactgcatggtgatgggctgcttcc-3' 5'-cgggcacgtgagtctagactccgaatc-3'
FNPTII RNPTII FEF1 REF1 PBS2 PBS1 T7 130 134 131 SMART II A 3'-RACE CDS 5'-RACE CDS UPM mix:Long Short	D R D R M13 directo M13 reverso D/R D R R D R R R D,R D,R	Interno NPTII, pKannibal Interno NPTII, pKannibal Interno ef1- α Interno ef1- α , Vectores de clonaje, sec Vectores de clonaje, sec Vectores de clonaje, sec Vectores de clonaje, sec pKannibal, sec pKannibal, sec adaptador 5' RT (RACE) RT (RACE-3') RT (RACE-5') PCR (RACE-5'-3') PCR (RACE-5'-3')	5'-ccgcaactctttacatttcc-3' 5'-gaactcgtcaagaaggcgata-3' 5'-tggtcgtgtgaaactgggt-3' 5'-tccttacctgaacgcctgtca-3' 5'-gtaaaacgacgcccagt-3' 5'-aacagtatgaccatg 5'-taatacgactcactatagg-3' 5'-gttcatttcattggaga-3' 5'-cgtcttacacatcatcacttg-3' 5'-tgcatcataggcgtctc-3' 5'-aagcagtggtatcaacgcagagtagcggg-3' 5'-aagcagtggtatcaacgcagagtagc(t) ₃₀ n ₁ n ₃ -3' (n = a, c, g, or t; n-1 = a, g, or c) 5'-(t) ₂₅ n ₁ n ₃ -3' (n = a, c, g, or t; n-1 = a, g, or c) 5'- taatacgactcactataggcgaacgagtggtatcaacgcagagtag-3' 5'-ctaatacgactcactatagggc-3'

M.3.3.2. Amplificación de ADN mediante PCR con ADN polimerasa termoestable

Para cada reacción se utilizaron 10-100 ng de ADN, 200 μ M de cada uno de los dNTPs, 1 μ M de cebadores D y R específicos, 2.5 μ L 10x PCR Buffer con 1.5 mM Mg²⁺ total, 1.25-2.5 U de ADN polimerasa termoestable y agua calidad PCR hasta un volumen total de 25 μ L. Para amplificaciones por PCR de rutina, (PCR de colonia, cuando el fragmento amplificado no es reutilizado, o para RT-PCR semicuantitativa, se utilizaron ADN polimerasas termoestables de diferentes casas comerciales (Sigma-Aldrich Química, España; MBL, Dominion; Eppendorff, etc), procedente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Taq). Estas Taqs presentan una baja fidelidad o alta tasa

de mutación por la ausencia de actividad correctora (exonucleasa 3'-5' o *Proof-reading*), y que poseen una actividad 3'-desoxiadenosina transferasa terminal, por la que añaden una molécula de dATP al extremo 3' de la hebra recién sintetizada y permiten, por tanto, la ligación de fragmentos de ADN por extremos cohesivos en vectores con extremos de T en 5' (*TA cloning*), como es el caso del vector pGEM-T Easy (Promega).

Para aplicaciones de clonaje que requerían de una mayor fidelidad, se utilizó una ADN polimerasa (*Pfu*) de la bacteria *Pyrococcus furiosus* (Promega), que presenta una tasa de mutación hasta 50 veces menor que las Taqs convencionales, al presentar una actividad correctora exonucleasa 3'-5' o *proof-reading*. Alternativamente, se utilizó la *iProof High Fidelity DNA polymerase* (BioRad). Estas enzimas tienen el inconveniente de que no presentan actividad 3'-desoxiadenosina transferasa terminal, dando lugar a fragmentos romos, inservibles para clonaje por *TA cloning* en vectores con extremos de T en 5' como pGEM-T Easy (Promega). En este caso, los fragmentos cohesivos con extensiones de A en 3' para *TA cloning* se consiguen, una vez acabada la reacción normal de PCR, añadiendo a la mezcla 2,5 u de Taq, como las mencionadas más arriba, y 200 µM de dATP, dejando proceder la reacción adicionalmente 30 min a 72°C.

Las ADN polimerasa de tipo *Pfu* suelen exhibir un bajo rendimiento o incluso nulo, para amplificaciones de más de 2kb. En estos casos se recurrió a la utilización de mezclas comerciales de ADN polimerasas, como la *JumpStart™ Accutag LA DNA polymerase mix* (Sigma-Aldrich Química, España), compuesta de una Taq convencional, con cierta cantidad de enzima *Pfu*, ambas, inactivadas a baja temperatura mediante interacción con un anticuerpo específico. A temperaturas por encima de la T^a de extensión, dicho anticuerpo es liberado, recuperando su actividad polimerasa, lo que permite una reacción de tipo *hot-start*, dando una amplificación más específica y de mayor rendimiento para fragmentos mayores de 2 kb, así como una fidelidad hasta 6.5 veces mayor que las Taqs convencionales. Para este tipo de polimerasa, se siguieron las indicaciones de tiempos y temperaturas dadas por el fabricante, particularmente, una T^a de extensión óptima de 68°C. Este mezcla, conserva la actividad 3'-desoxiadenosina transferasa terminal, lo que permite la ligación de fragmentos de ADN por extremos cohesivos (*TA cloning*).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usualmente en un termociclador *Eppendorff Mastercycler Personal*, excepto para el caso de reacciones de RACE 5-3',

que se utilizó un termociclador *Perkin-Elmer GeneAmp Systems modelo 2400*, recomendado en las instrucciones del fabricante. Más abajo se muestra un programa tipo cuyas condiciones de tiempos, ciclos y temperaturas se modificaron en función de las siguientes variables:

- Las temperaturas de anidamiento elegidas, se variaron de acuerdo a la T_m (temperatura de fusión) de las parejas de cebadores utilizadas (aproximadamente entre $3-7^\circ\text{C}$ por debajo de la T_m), calculadas por la empresa suministradoras de oligos (TIB-MOL.BIOL, Berlín), por un abordaje termodinámico.

- El tiempo de extensión, siguiendo la regla general de 1 min por kb. En el caso de las mezclas de Taq polimerasas de mayor fidelidad, se siguieron las recomendaciones del fabricante respecto a los usos de temperatura y tiempo de reacción.

- El número de ciclos variable (25 a 35) en función del objetivo de la amplificación (rutina, clonaje, RT-PCR semicuantitativa).

94 °C	3 min	Desnaturalización	25-35 ciclos
94 °C	30 s	Desnaturalización	
$T_m-(3-7^\circ\text{C})$	45 s	Anidamiento	
72 °C	1 min/kb	Extensión	
72 °C	5-7 min	Extensión final	
4-10°C	∞		

M.3.4. Ligación y subclonado del producto de PCR

En la mayoría de los casos, los productos de PCR se purificaron en geles de agarosa como se describe en el **apartado M.2.4.**, y se ligaron al vector plasmídico pGEM[®]-T por extremos cohesivos de Adenina en 3', como describen las instrucciones del fabricante (Promega), utilizando una razón inserto:vector ($n=i/v$), generalmente, entre 1:1 y 3:1, siguiendo la fórmula (Sambrook et al., 1989):

$$\frac{25 \text{ ng de plásmido} \times \text{longitud de inserto (kb)} \times n}{\text{longitud de plásmido (Kb)}} = \text{ng de inserto} \quad (\text{Ec. 1})$$

Brevemente, una cantidad adecuada en nanogramos de fragmento purificado se mezcló con 0.5 μL de vector pGEM[®]-T (25 ng), 1x de tampón T4 ADN ligasa y 1 U de T4 ADN ligasa (1 U μL^{-1}), en un volumen total de 10 μL , transcurriendo la reacción durante 1 hora a 22°C o 24 h a 4°C. Un volumen variable de ligación (1-10 μL) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*, como se describe en el **apartado M.1.1.3.** de transformación de *E. coli*.

En unos pocos casos, los productos amplificados por PCR con cebadores diseñados con sitios de restricción en su secuencia (**Tabla M4**), fueron ligados directamente a los vectores de expresión de levaduras o plantas, previa digestión, tanto del producto de PCR como el plásmido de destino, con los enzimas de restricción adecuados, como se describe en los **apartados M.3.5.** y **M.3.6.**

M.3.5 Restricción de fragmentos de ADN

La digestión con enzimas de restricción, bien de fragmentos de ADN o de plásmidos, se han llevado a cabo siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante respecto al tipo de tampón y temperatura de reacción (Roche Diagnostics). Una reacción de digestión tipo incluía 1-5 μg de plásmido ó 100-500 ng de fragmento de ADN, 1x de tampón específico de cada enzima y 1-5 U de enzima (1 U es definida como la cantidad de enzima que digiere 1 μg de ADN en 1 h en las condiciones óptimas de reacción) en un volumen total de 10-20 μL , incubándose la reacción durante 1-2 h a las condiciones óptimas de T^a específica para cada enzima, generalmente 37°C.

En la mayoría de los casos se utilizaron dobles digestiones con enzimas diferentes, lo que permitía el subclonado unidireccional del inserto en el vector plasmídico. Siempre que fue posible, se eligieron sitios de restricción cuyos enzimas presentaran condiciones óptimas similares o compatibles de reacción (tipo de tampón, T^a , etc.), de acuerdo con el esquema de compatibilidades suministradas por el fabricante (Roche Diagnostics). En el caso de incompatibilidad de las condiciones de reacción de los enzimas, se llevó a cabo una digestión secuencial, primero con un enzima con su tampón específico en un volumen pequeño de reacción (10 μL). Tras 2 h de incubación, se diluyó 2-3 veces el volumen total, después de añadir la segunda restrictasa, y su tampón específico a una concentración 1x, procediendo la reacción durante 2 horas adicionales. Alternativamente, en unos pocos casos, tras la digestión con el primer enzima, el ADN se precipitó con acetato sódico 0.3 M y 2-3 volúmenes de etanol al

95% (v/v), incubando a -20°C durante 30 min. Después de una centrifugación de 10 min a 16000 g, el sedimento se lavó con etanol al 70% (v/v), se secó y se resuspendió en un volumen adecuado de tampón TE o agua milliQ, tras lo cual se digirió con el segundo enzima.

En el caso de digestión con un único enzima de restricción, se llevó a cabo una reacción adicional de defosforilación de los extremos 5' del vector de clonación, con objeto de evitar su religación, por la T4 ADN ligasa (**apartado M.3.6.**). Para ello, se añadió después de la digestión 1-2 U de fosfatasa alcalina de gamba (SAP -*shrimp alkaline phosphatase*), a la mezcla de digestión, incubándose a 37°C durante 30 min. La fosfatasa se inactivó posteriormente a 65°C durante 10 min.

Los productos de la digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de TAE y subsiguiente extracción como se describe en el **apartado M.2.4.**

M.3.6. Subclonado en vectores de expresión de levaduras y plantas

La ligación de los fragmentos de ADN, directamente digeridos o liberados tras la digestión sobre plásmido pGEM-T, se llevó a cabo utilizando el *kit* de ligación *Rapid DNA ligation kit* (Roche Diagnostic), siguiendo las instrucciones del fabricante, y que fueron muy similares a las indicadas en el **apartado M.3.4.** Brevemente, cantidades adecuadas de inserto y de vector calculadas por la ecuación 1 (**apartado M.3.4**) se diluyeron en un volumen total de 20 µL, que contenía 1x tampón de dilución de ADN, 1x tampón de ligasa y 5 U de bacteriófago T4 ADN ligasa.

Un volumen variable de ligación (1-10 µL) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*, como se describe en al **apartado M.1.1.3.** de transformación de *E. coli*.

M.3.7. PCR a partir de colonias de bacterias y levaduras

Previo al aislamiento del ADN plasmídico, la presencia del inserto apropiado en diferentes colonias se escrutó por PCR directa de las mismas, picando con un palillo de madera estéril, 15 a 20 colonias independientes y poniéndolas en un tubo con 50 µl de agua estéril (haciéndose replicas de cada colonia tomada, tocando con el palillo una

placa fresca previa a su transferencia al tubo). Tras el calentamiento de los tubos a 95°C, para lisar las células y desnaturalizar las DNAsas, el extracto se centrifugó a 16000 g durante 1 min, utilizándose 10 µl de sobrenadante como molde para la reacción de PCR (25 µl) que contenía 0.2 µM de cebadores universales PBS1 y PBS2 o cebadores específicos del gen de interés (**Tabla M4**). El protocolo de amplificación consistió en 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, con una extensión final de 5 min a 72°C. Las colonias positivas en cuanto a la presencia de inserto del tamaño esperado se seleccionaron para el aislamiento de ADN plasmídico en formato *miniprep* (**apartado M.2.2.**).

M.3.8. Secuenciación del ADN y análisis bioinformático

La identificación positiva, así como la obtención de la secuencia y comprobaciones de la fidelidad de la misma de cada uno de los clones que contenían los insertos parciales y/o los ORFs (*open reading frames*- marco de lectura abierto-) de los genes objeto de estudio se hizo mediante secuenciación en un secuenciador automático de fluorescencia (ABI-Prism) utilizando el *Kit* de secuenciación *ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, PE Applied Biosystems), llevado a cabo por el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación, Instituto de Parasitología y Biomedicina, López Neyra, CSIC, Granada. La calidad de la secuenciación abarcaba, por término medio, unas 700-1000 pb. Las muestras se prepararon para su envío a dicho servicio en un volumen final de 12 µl de agua miliQ esterilizada, calidad PCR, conteniendo 500 ng de ADN plasmídico o 30-90 ng de fragmento de PCR purificado y 3.2 picomoles de cada uno de los cebadores, directo o reverso, para la secuenciación en ambos sentidos, de las zonas que flanquean la zona de inserción o cebadores específicos del fragmento clonado (**Tabla M4**).

El ensamblaje de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa *Sequencher™4.1.4* (Gen Code Corporation). La búsqueda de secuencias homólogas se llevó a cabo mediante los programas BLAST (Altschul al. 1997) o FASTA (Pearson y Lipman 1988), consultando las bases de datos de bancos génicos generales, principalmente, GenBank, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) EMBL, (<http://www.ebi.ac.uk/Databases/>) y DDBJ, (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/searches-e.html>), ARAMENNON *plant membrane protein database* (<http://crombec.botanik.uni->

koeln.de/), o específicos de tomate, como el *International Solanaceae Genomics Project* (SOL) (<http://www.sgn.cornell.edu/>); *DFCI Tomato Gene Index*, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tomato>; o el *Kazusa DNA Research Institute, MiBASE Micro-Tom Database*, <http://www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/indexj.html>). El alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, así como elaboración de árboles filogenéticos se llevó a cabo utilizando el programa Clustal W (Thompson et al. 1994), junto a otras herramientas bioinformáticas de uso libre disponible en Internet, (*BCM Search Launcher*, <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu/>; Expasy, <http://www.expasy.org/tools/>) o utilizando diferentes programas en paquetes integrados (NTI Advance 9.0, Informax; DNAMAN 6.0, Lynnon Corporation).

M.4. Purificación y análisis de ARN

M.4.1. Extracción de ARN total de plantas

Todo el material utilizado para la extracción de ARN fue tratado de forma adecuada para la eliminación de toda fuente de contaminación de ARNasas (Sambrook et al 1989). El material de vidrio y de porcelana se trató durante 4 h a 170°C y el material de plástico utilizado, como puntas de pipeta y tubos de plástico, si bien, fue de calidad libre de ARNasas, se autoclavaron de nuevo. El agua y soluciones utilizadas se trataron con 0.1% (v/v) DEPC (dietil pirocarbonato) durante al menos 12 h en agitación, tras lo cual se autoclavaron para inactivar el DEPC, manteniéndose posteriormente en agitación durante otras 12 h adicionales, para la disipación de los productos de desecho del DEPC.

Previamente se recogieron las raíces, lavadas cuatro veces en agua destilada, tallos y hojas y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido, almacenándose finalmente a -80 °C. Para la extracción de ARN total de tejidos de plantas se utilizaron dos protocolos alternativos. Uno primero, mediante el *kit RNeasy Minikit* de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante, que incluye un paso de tratamiento con ADNasa libre de ARNasas (Qiagen), para evitar contaminación de ADN genómico. Un segundo método, mediante el reactivo *Tri-ReagentTM* (Sigma-Aldrich Química, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de ARN utilizando el reactivo *Tri-ReagentTM* se basa en la solubilidad de las moléculas (ácidos nucleicos/contaminantes) en dos fases no miscibles. Dicho reactivo está compuesto por una mezcla de fenol (donde los ácidos

nucleicos son insolubles) y tiocianato de guanidinio (agente desnaturizante de proteínas e inhibidor de proteasas) a pH 4.5. Así, la integridad del ARN se mantiene durante la extracción. La adición de cloroformo, seguida de una etapa de centrifugación permite separar la fase acuosa que contiene el ARN de la fase orgánica (proteínas y ADN). El ARN se recupera mediante una precipitación con isopropanol. Para ello, en mortero previamente enfriado con N₂ líquido, el tejido se trituró hasta formarse un polvo muy fino (el tejido en polvo puede almacenarse a -80 °C durante un mes). Se añadió 1mL de *Tri Reagent* por cada 100 mg de tejido de partida, y se agitó vigorosamente utilizando un vortex. Tras centrifugar 10 min a 12000 g a 4°C, se añadió al sobrenadante 0.2 mL de cloroformo, agitándose y después, dejándose reposar 10 min a temperatura ambiente. Después de centrifugar 15 min a 12000g a 4°C para separar dos fases, la fase acuosa se transfirió a un tubo estéril de 1.5 mL. El ARN total se precipitó añadiendo 500µL de isopropanol, mediante incubación durante 10 min a temperatura ambiente y posterior centrifugación a 16000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado de ARN se lavó con 1 mL de etanol al 70% (v/v) en agua-DEPC, secándose durante 10 min a temperatura ambiente.

Para ambos métodos, cada muestra de ARN total se resuspendió en 35-40 µL de *RNasecure*TM *Resuspension solution* (Ambion Europa, Ltd), con la ayuda de la pipeta, y se incubó durante 10 min a 60°C, para minimizar la degradación del ARN, como describen las indicaciones del fabricante. Finalmente, el ARN se almacenó en alícuotas a -80°C, para su uso posterior, de manera que cada una de ellas no sufriera mas de dos ciclos de congelación/descongelación. La calidad del ARN y ausencia de degradación o contaminación con ADN genómico se comprobó mediante la visualización al UV en analizador de imagen de las bandas de ARN ribosómico en geles de TBE con bromuro de etidio.

M.4.2. Cuantificación de ARN

La cuantificación espectrofotométrica de la concentración y pureza del ARN se realizó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies). La cuantificación y determinación del grado de pureza del ARN se realizó mediante el registro del espectro de absorbancia entre 230 y 320 nm, teniendo en cuenta que la $A_{260}=1$ corresponde a una concentración de 40 µg ARN total por mL. Todas las

preparaciones de ARN tuvieron una razón A_{260}/A_{280} superior a 1.8 y A_{260}/A_{230} superior a 2.0, indicando mínima contaminación por proteínas y polisacáridos, respectivamente.

M.4.3. RT-PCR

Esta técnica se ha empleado fundamentalmente para la obtención de fragmentos de ADN y/o de insertos conteniendo la secuencia nucleotídica completa de los genes de interés, así como método alternativo a la hibridación *Northern* para el estudio de la expresión génica. Se basa en la síntesis de una hebra de ADN complementaria (ADNc) a partir del ARN mensajero (ARNm) contenido en el ARN total aislado del tejido, por medio de una reacción de retrotranscripción, RT (Sambrook et al., 1989). Para ello, se ha utilizado el *kit* de RT-PCR *Enhanced Avian HS Reverse Transcription kit* (Sigma-Aldrich Química, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit combina la actividad retrotranscriptasa mejorada del virus de la mieloblastosis de ave (eAMV-RT), junto con la *JumpStart™ Accutaq LA DNA polymerase mix*, lo que da lugar a amplificaciones robustas y de mayor fidelidad de hasta 6 veces la Taq convencional (**apartado M.3.3.2.**). La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en dos pasos separados, que puede sintetizar el ADNc a partir de los sitios determinados por los cebadores empleados:

- Cebador Oligo (dT)₂₃ anclado, en la que el último nucleótido en dirección 5' contiene todas las combinaciones de bases posibles, para poder anclarse a la primera base complementaria en dirección 3' inmediatamente a continuación de la cola de poliadenosinas (poliA) del ARN mensajero. Con ello se generaría ADNc de todos los ARNm contenidos en el ARN total por la acción del enzima reversotranscriptasa, y por tanto servir de molde para la amplificación de fragmentos de ADN de diferentes genes en la reacción de PCR subsiguiente.

- Cebador 9-mer al azar (*random primer*), que contiene todas las combinaciones de nucleótidos posibles en cada una de las 9 posiciones del cebador, lo que permite su anidamiento en cualquier región del ARNm, lo que permite su uso como molde en la amplificación de fragmentos de ADN de diferentes genes en la reacción de PCR subsiguiente.

- Cebador reverso específico, que contiene una secuencia complementaria específica del gen de interés.

Los dos primeros cebadores están incluidos en el *kit* de RT-PCR utilizado

En este trabajo, la reacción de RT se llevó a cabo rutinariamente en dos pasos, utilizando el cebador reverso específico para el clonado de genes, y el oligo(dT)₂₃, para el caso del análisis de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativa.

Para la síntesis de la primera hebra de ADNc se utilizaron 4 µg de ARN total tratado con ADNasa libre de ARNasa (**apartado M.4.1.**), 500 µM de dNTPs, 3.5 µM Oligo(dT)₂₃ o 1µM de cebador reverso específico, en un volumen de 10 µL. Tras incubar la mezcla a 70C° durante 10 min y un rápido enfriado en hielo, con objeto de desnaturalizar el ARN, se añadió al tubo eppendorff de 0.2 mL, 1 U inhibidor de ARNasa, 1x tampón de eAMV-RT y 1 U de enzima eAMV-RT, en un volumen total de 20 µL, incubándose a 48°C durante 50 min. El cDNA se utilizó inmediatamente o se guardó a -20C° hasta su uso posterior.

La reacción de PCR subsiguiente tuvo lugar en un segundo paso utilizando como molde, de 1 a 2.5 µL de la reacción de RT, cebador directo y reverso del gen de interés y demás ingredientes como se describe en el **apartado M.3.3.2.**

M.4.4. Reacción de RACE-5'-3'

La técnica de RACE o *Rapid amplification of cDNA ends* es una variante de la reacción de RT-PCR que permite la amplificación de secuencias desconocidas de ADNc correspondientes a los extremos 3' o 5' del ARNm, lo que posibilita la obtención del ORF del gen de interés, conociendo una secuencia central del mismo. Para ello, se ha utilizado el *SmartTM 5'-3' RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech, BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. En ambos casos, el primer paso implica la síntesis de la primera cadena de ADNc con el adaptador sintético SMARTII ATM y cebadores reversos 5'-CDS y 3'-CDS suministrados por el *kit* que se unen al transcrito en 5' o 3' (**Fig M2, M3**) en dos reacciones separadas, utilizando la *PowerScriptTM-RT*. Esta transcriptasa es una variante de la MMLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*), que una vez alcanza el extremo 5' del molde de ARN, exhibe actividad transferasa terminal, añadiendo de 3 a 5 residuos de dC al extremo 3' de la primera hebra de ADNc. Ello permite al cebador SMARTII ATM, que presenta un extremo 3' con 3 dG, anidarse al extremo 5' del transcrito y ser añadido por la RT a la secuencia completa de la primera hebra de ADNc (**Fig M2**), una vez cebada la reacción con el reverso 5'-CDS (una variante de oligo (dT) (**Tabla M4**).

Para la reacción de RACE-5' se utilizó como molde 1 µg de ARN total del tejido de interés, 1 µL de cebador SMARTII ATM, 1 µL del reverso 5'-CDS, en un volumen total de 5 µL. Para la reacción de RACE-3', se añadió 1 µg de ARN total y el oligo (dT), 3'-CDS (**Tabla M4**), en un volumen total de 5 µL. Tras incubar ambas mezclas a 70°C durante 2 min, se añadió a cada reacción de RACE, 1x tampón de RT; 1 mM DTT; 1 mM mezcla de dNTPs y 1 µL de *Power Script* Reverso Transcriptasa, en un volumen total de 10 µl, incubándose a 42°C durante 1.5 horas. La dos poblaciones de primeras hebras de ADNc así obtenidas se diluyeron 1/10 con tampón Tricina-EDTA (10 mM Tricina-KOH, pH 8.5, 1 mM EDTA), se incubaron a 72 °C durante 7 minutos y se almacenaron en alícuotas a -20 °C hasta su utilización.

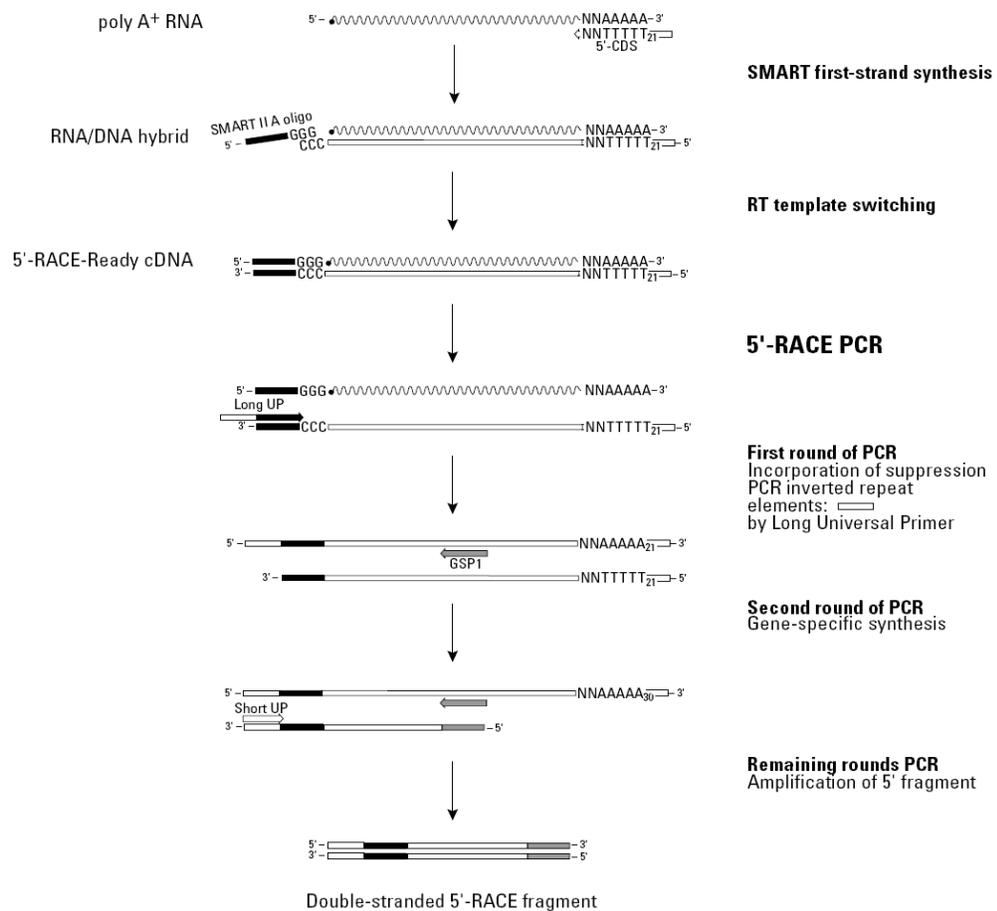


Fig M2. Reacción de RACE-5'.

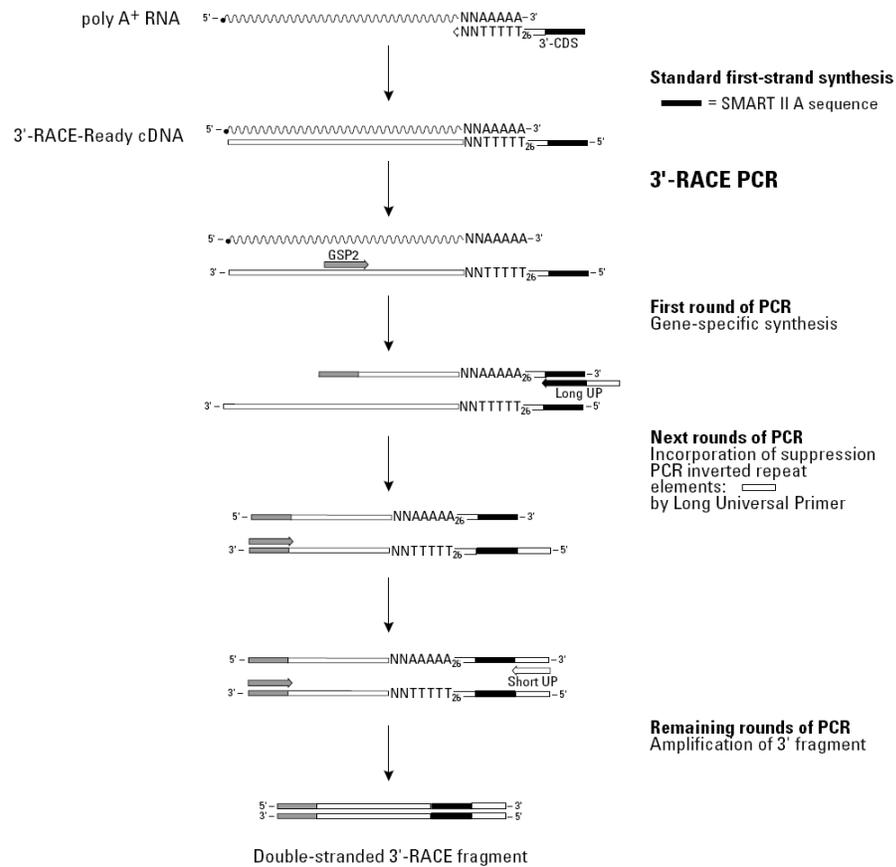


Fig M3. *Reacción de RACE-3'*

Para la reacción de PCR subsiguiente, deben diseñarse cebadores específicos, una vez conocida la secuencia nucleotídica de una región central del gen de interés: uno directo, (GSP1), para amplificar el extremo 3' del ADNc (RACE-3') (Fig M3, M4), y otro reverso (GSP2) (Fig M2, M4), para la amplificación del extremo 5' del ADNc (5'RACE), ambos con una Tm de >70 °C:

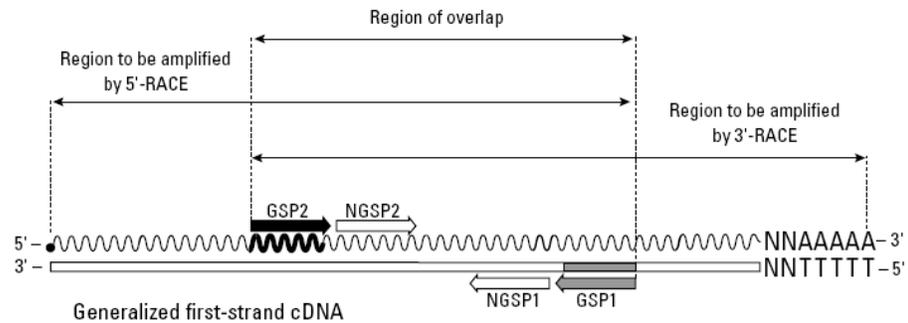


Figura M4. Relación entre cebadores específicos para RACE-5'-3' y molde de ADNc.

La reacción de PCR subsiguiente de RACE-5' (**Fig M2**), contenía 1-2.5 μ L de RACE-5' RT, 0.2 μ M de GPS1 como cebador reverso, y 1x UPM (*universal primer mix*), como cebador directo que contiene una mezcla de oligos *long* y *short* (**Tabla M4**); para PCR de RACE-3' (**Fig M3**), contenía el cebador directo GSP2 y 1x UPM (*universal primer mix*), como cebador reverso. Finalmente, se le añadieron a ambos tipos de reacción, el *master mix*, que contenía 1x tampón de PCR, 0.5 mM dNTPs y 1x de *Advantage 2 Polymerase mix* (formado por una mezcla de TITANIUMTM Taq polimerasa mas anticuerpo TaqStartTM, que proporciona un *hot-start* automático, y una cantidad menor de polimerasa *proof-reading* -*Pfu*-) en un volumen total de 25 ó 50 μ L. El 1x UPM (*universal primer mix*) contiene una mezcla de oligos *long* y *short* (**Tabla M4**); que reconoce la secuencia SMARTII (**Fig. M2, M3**), de manera que utilizado como cebador directo en RACE-5', junto con el reverso específico GSP1, amplificará el fragmento 5' de ADNc comprendido entre ambos cebadores (**Fig. M2**). Asimismo, el 1x UPM, utilizado como reverso y el directo GSP2 en la reacción de RACE-3', amplificará el extremo 3' desde la cola de poliA hasta el lugar al cual se uniría el cebador GSP2 (**Fig M3**).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando las condiciones de T^a, ciclos, y tipo de termociclador (*Perkin-Elmer GeneAmp Systems mod. 2400*), recomendadas en las instrucciones del fabricante, y que se describen en la **Tabla M5**. Los productos de PCR se separaron y purificaron por electroforesis en gel de agarosa como se describe en el **apartado M.2.4.**, y se secuenciaron (**apartado M.3.8**) directamente, o previamente subclonados en pGEM-T (**apartado M.3.4.**). Todas las secuencias se ensamblaron

utilizando el programa *Sequencher* (**apartado M.3.8**) hasta revelar el ORF completo. La obtención del inserto con el ORF completo, se llevó a cabo mediante PCR utilizando como molde la reacción de RACE-5'-RT y cebadores directo y reverso conteniendo el codon de inicio y de stop, respectivamente, así como sitios de restricción apropiados para ser clonados unidireccionalmente en los respectivos vectores de expresión de levaduras y plantas, directamente o previo subclonado en pGEM-T (**apartado M.3.6**).

Tabla M5. Condiciones utilizadas en la reacciones de PCR para RACE-5'-3'.

94 °C	5 min	Desnaturalización	
94 °C	5 seg	Desnaturalización	5 ciclos
72°C	3 min	Anidamiento/Extensión	
94 °C	5 seg	Desnaturalización	5 ciclos
70 °C	10 seg	Extensión	
72 °C	3 min	Extensión	
94 °C	5 seg	Desnaturalización	30-35 ciclos
65°C	10 seg	Anidamiento	
72°C	3 min	Extensión	
72°C	7 min	Extensión final	

M.4.5. Análisis de la expresión génica por hibridación *Northern*

M.4.5.1. Marcaje de las sondas de ADNc con ³²P-dCTP por cebamiento al azar

Las sondas de ADNc se marcaron y purificaron como se describe en el **apartado M.3.2.2**. Como ADN molde para la reacción (40 ng de fragmento de ADN en 45µL de TE) con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, se utilizaron los siguientes fragmentos amplificados por PCR usando los cebadores indicados (**Tabla M4**):

- SISOS1: fragmento de 1148 pb obtenido con los cebadores FS1Xba-5R1.7, que abarca la región N-terminal.

- SISOS2: fragmento de 832 pb obtenido con los cebadores S2F-S2R, que abarca parte del ORF y el extremo 3' no traducido.
- SISOS3: fragmento de 650 pb obtenido con los cebadores S3FXho-S3RNot, que abarca el ORF completo del gen.

M.4.5.2. Separación del ARN en geles desnaturalizantes de formaldehído

Se ha seguido el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989) con modificaciones. Muestras de ARN total (15 µg) se disolvieron en 35 µL de tampón de muestra conteniendo 6.0 % (v/v) de formaldehído, 1x tampón MAE (20 mM MOPS, pH 7.0, 8 mM acetato sódico, 1 mM EDTA), 5 % (v/v) glicerol, 50 % (v/v) formamida desionizada, 0.04 % azul de bromofenol y 0.5 % µg mL⁻¹ bromuro de etidio, incubándose 10 min a 65 °C. Tras enfriar las muestras en hielo, se cargaron en un gel de agarosa al 1.25 % (p/v) en 1 x MAE, conteniendo formaldehído al 1 % (v/v), y se corrió a 7.5 V cm⁻¹, durante 2 horas, en tampón 1x MAE.

Tras el desarrollo electroforético, el gel se lavó con agua-DEPC, 2 veces 20 min en 2x SSC (0.3 M NaCl, 30 mM citrato sódico, pH 7.0) para eliminar el formaldehído, registrándose la imagen digitalmente en un analizador de imagen Gel Doc 2000 (Bio-Rad Molecular Imagen System) provisto del programa de análisis de imagen, *Quantity One Software*, para comprobar la igualdad de carga y la ausencia de degradación.

M.4.5.3. Transferencia del ARN a filtros de membranas de nylon cargados positivamente (*Northern blot*)

El ARN se transfirió a membranas de nylon (*HybondTM N⁺*, 0.2 µm de poro, Amersham, Pharmacia Biotech) por capilaridad, para hibridación *Northern* (Sambrook y col. 1989) en 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico, pH 7.0), durante 12-16 horas. El sistema de transferencia se formó de abajo a arriba como se describe en el apartado M.3.2.1 (Fig. M1). Finalizada la transferencia, la membrana se lavó con 2x SSC y el ARN se fijó covalentemente a la misma en un horno de vacío a 120 °C durante 20 min entre piezas de papel *Wathman 3 MM*.

M.4.5.4. Condiciones de hibridación

La hibridación se llevó a cabo por el método del PSE (Church y Gilbert 1984), consistente en la prehibridación a 65 °C con 0.3 mL cm⁻² con medio PSE que contenía 7 % (p/v) SDS, 0.3 M fosfato sódico, pH 7.2 y 1 mM EDTA. Posteriormente, las membranas se hibridaron a 65 °C, durante 10-16 h con 30 µL cm⁻² de medio PSE con sonda marcada. Los lavados (0.5 mL cm⁻²) tuvieron lugar a 65°C con dos veces 4x SSC, 0.1 % (p/v) SDS, durante 15 min y una vez con 0.4x SSC, 0.1 % (p/v). En algunos experimentos se usó como alternativa para prehibridación e hibridación, la incubación a 42 °C con *ULTRhyb® ultra sensitive hybridation buffer* (Ambion Europa, Ltd), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso, los lavados fueron 2x SSC, 0.1 (p/v) SDS, a 42 °C durante 5 min cada uno, 2x en 0.1x SSC, 0.1 (p/v) SDS, a 42° durante 15 min, y uno en 0.1x SSC, 0.1 (w/v) SDS, a 60 °C durante 20 min.

M.4.5.5. Detección y cuantificación de los niveles de expresión génica

Cada membrana se envolvió con papel transparente de plástico y se introdujo en un casete de autorradiografía conteniendo una pantalla de *Phosphorimager* (BAS IP-MS 20 x 40 S, Fujifilm) y las señales de hibridación se registraron en un analizador de *Phosphorimager* (Bio-Rad Molecular Imagen System). Los niveles de expresión génica para cada muestra, se cuantificaron midiendo la intensidad de la banda de ARNm del gen de interés en relación a la intensidad de la banda del ARN ribosómico 18S de tomate, teñida con bromuro de etidio, mediante el programa *Quantity One* (Bio-Rad Molecular Imagen System).

M.4.6. Análisis de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativa

Para la obtención de la primera hebra de ADNc se utilizaron 4 µg de ARN total previamente tratado con ADNasa libre de ARNasa, cebador oligo (dT)₂₃, así como el resto de ingredientes y condiciones de reacción de RT descritas en el **apartado M.4.3.**

En la reacción de PCR subsiguiente, se utilizó una Taq DNA polimerasa termoestable (MBL Dominion). Se llevaron a cabo ensayos previos para la optimización del número de ciclos y cantidad de molde adecuado para conseguir, tras la separación por electroforesis en gel de agarosa, intensidades de banda teñidas con bromuro de etidio (analizadas mediante el programa *Quantity One*, Bio-Rad Molecular Imagen System), en el rango lineal (no saturante) del gen de interés y del gen control. Usualmente un número de 21-30 ciclos suele ser adecuado. Como gen control se ha elegido el factor de elongación de tomate, *efl-α* (nº acc AB061263), que da un fragmento de ADN de 366pb utilizando los cebadores FEF1 y REF1 (**Tabla M4**), cuya expresión es constitutiva y estable en condiciones de estrés ambiental (Nicot et al. 2005).

M.5. Complementación funcional del sistema SOS en levaduras (*drop-tests*)

La primera aproximación para comprobar que las proteínas codificadas por los genes putativos de la ruta SOS de tomate constituyen los verdaderos ortólogos de AtSOS, se ha llevado a cabo mediante la reconstitución funcional del sistema SISOS en levaduras de la cepa mutante AXT3K (*Δnhx1*, *Δena1-4*, *Δhah1*), defectiva en todos los transportadores de Na⁺ conocidos (Quintero et al. 2000) (**apartado M.1.2.1**).

M.5.1. Plásmidos de levadura utilizados

Los vectores de expresión de levadura utilizados pYPGE15, p414GPD, pDR195, pSOS1-1, pSOS2T/DΔ308 y pFL32T y los insertos que portan se describen en la **Tabla M3** (**apartado M.2.1**). Los plásmidos pYPGE15-SISOS1, p414GPD-SISOS2 y pDR195-SISOS3 se construyeron como se describe en el **apartado R.1**.

La cepa mutante AXT3K es auxótrofa para adenina, triptófano y uracilo. Puesto que los plásmidos pYPGE15-SISOS1 y pDR195-SISOS3 contenían el mismo marcador *URA* y p414-GPD-SISOS3 proveía de un marcador *TRPI*, solo se pudieron hacer transformaciones con combinaciones de plásmidos que proveían de dichos marcadores en medios selectivos SD sin Uracilo y/o sin Triptófano. Así, las cepas se transformaron con las siguientes construcciones o combinaciones de construcciones de los genes de tomate entre sí o en combinación con diferentes versiones de Arabidopsis (**apartado M.1.2.3**).

pYPGE15-SISOS1

pYPGE15-SISOS1 + pSOS2T/DΔ308

pYPGE15-SISOS1+ pFL32T(AtSOS2-AtSOS3)

pSOS1-1(AtSOS1)

pSOS1-1(AtSOS1) + pSOS2T/DΔ308

pSOS1-1(AtSOS1) + pFL32T

p414GPD-SISOS2

pDR195-SISOS3

pSOS2T/DΔ308

pFL32T (AtSOS2-AtSOS3)

Para obviar la falta de marcadores de selección en la transformación de levadura que permitiera la caracterización funcional de *SISOS2* y *SISOS3*, se recurrió a la utilización de la cepa de levadura YP890 (Guo et al., 2004), derivada de la cepa AXT3K, la cual lleva insertado en la región cromosomal 3' no traducida del gen *CYCI* un casete de expresión *PGK1:AtSOS1:CYCI* (Guo et al. 2004) (**apartado M.1.2.1**). Esta cepa se transformó con las construcciones plasmídicas siguientes:

YP890 (*PGK1:AtSOS1:CYCI*) + p414GPD-SISOS2

YP890 (*PGK1:AtSOS1:CYCI*) + pDR195-SISOS3

YP890 (*PGK1:AtSOS1:CYCI*) + pSOS2T/DΔ308

YP890 (*PGK1:AtSOS1:CYCI*) + p414GPD-SISOS2

YP890 (*PGK1:AtSOS1:CYCI*) + pDR195-SISOS3

YP890 (*PGK1:AtSOS1:CYCI*) + p414GPD-SISOS2 + pDR195-SISOS3

Para la reconstitución del sistema completo de SOS de tomate en levadura se intentó una aproximación idéntica a la utilizada por Guo et al., (2004), insertando el casete de expresión *PGK1:SISOS1:CYCI* en la región cromosomal 3' no traducida del gen *CYCI* de la cepa AXT3K. Para ello, se digirió pYPGE15 con *NsiI*, que eliminaba un fragmento de aproximadamente 2 kb conteniendo el origen de replicación 2 μm, aunque destruía el marcador *URA*. Tras la religación con T4 ADN ligasa (**apartado M.3.6**), el

ORF de *SISOS1* se subclonó en el sitio *XbaI-Sall* y se transformó en *E. coli*. Finalmente, el plásmido recuperado se linearizó cortando con *MluI* en su sitio situado en el terminador *CYCI*. La cepa AXT3K se transformó con el plásmido linearizado portando el casete de expresión *PGK1:SISOS1:CYCI* y se sembró en medio SD con 100 mM NaCl como factor de selección. La presencia de la construcción en el genoma de la levadura se detectó por PCR de colonia utilizando cebadores específicos de *SISOS1*. La cepa AXT3K con *SISOS1* insertado por recombinación homóloga en el cromosoma de la levadura, se transformó con las mismas construcciones plasmídicas descritas para la cepa YP890.

M.5.2. Test de complementación (*Drop test*)

Todas estas construcciones expresadas en la levadura se ensayaron en experimentos de *drop test* (*test de las gotas*) de restauración de la tolerancia del fenotipo hipersensible a la sal en medio AP suplementado con 1mM KCl y diferentes concentraciones de NaCl (Shi et al. 2002, Quintero et al. 2002). Para ello, se hicieron precultivos líquidos de 3 mL en AP suplementados con 1 mM KCl y los aminoácidos requeridos, que se inocularon con una alícuota, a una DO_{660} 0.04, de cada una de las diferentes versiones transformantes, creciendo toda la noche a 30°C en agitación a 200rpm. Tras medir la DO_{660} final, los cultivos se centrifugaron a 3000 g durante 5 min y se resuspendieron a una DO_{660} de 1.0 con agua estéril. Para llevar a cabo los *drop tests*, se aplicaron 5 μ L de cada una de las versiones transformantes diluidas seriadamente a 4 concentraciones (1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) y se aplicaron sobre una placa en medio sólido AP suplementado con 1 mM KCl, los aminoácidos requeridos y diferentes concentraciones de NaCl. Las placas crecieron de 3-4 días a 30°C, tras lo cual se fotografiaron en el analizador de imagen Gel Doc 2000 (Bio-Rad Molecular Imagen System).

M.6. Complementación funcional de mutantes *sos* de *Arabidopsis* con los genes *SISOS*

M.6.1. Construcciones génicas para sobreexpresión en *Arabidopsis*

Los ORFs de *SISOS1*, *SISOS2* y *SISOS3* se subclonaron en el plásmido pCAMBIA 1303, bajo control del promotor constitutivo *CaMV35S*, sustituyendo los genes reporteros *gusA* y *GFP*, por los respectivos insertos (Tabla M6, Fig M5, <http://www.cambia.org/>, Roberts et al. 2003), previo subclonaje en pGEM-T (apartado M.3.6).

Concretamente, el ORF de *SISOS1* se amplificó por PCR con la *iProof High Fidelity DNA polymerase* (BioRad) utilizando como molde el plásmido pYPGE15-SISOS1 (apartado M.1.2.1.) y los cebadores FS1Nco2-RS1Bst2 (Tabla M4), que contenían un sitio *NcoI* y *BstIII*, respectivamente, para ser clonado de forma unidireccional, en el sitio *NcoI* y *BstIII* del vector.

El ORF de *SISOS2* se amplificó por PCR con la *iProof High Fidelity DNA polymerase* (BioRad), utilizando como molde, p414GPD-SISOS2 (apartado M.1.2.1.) y los cebadores FS2Bgl-RS2Bbr, que contenían un sitio *Bgl II* y *Pml* (isosquízómero *BbrPI*), respectivamente, para ser clonado en el sitio *Bgl II* y *Pml* (*BbrPI*) del vector.

El ORF de *SISOS3* se amplificó por PCR con la *iProof High Fidelity DNA polymerase*, utilizando como molde pDR195-SISOS3 (apartado M.1.2.1.) y los cebadores FS3Nco-RS3Bbr, que contenían un sitio *NcoI* y *Pml* (isosquízómero de *BbrPI*), respectivamente, para ser clonado de forma unidireccional en los sitios *NcoI* y *Pml* (*BbrPI*) del vector.

Las construcciones se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV3101 (apartado M.1.1.4.), y la fidelidad de las secuencias se comprobaron por secuenciación (apartado M.3.8).

Tabla M6. Construcciones génicas utilizadas para la transformación de *Arabidopsis*

	Características relevantes
pCAMBIA1303	Vector de expresión, promotor 35S, Hígromicina ^R

pCAMBIA1303-SISOS1	SISOS1, clonado en vector pCAMBIA1303 entre los sitios <i>NcoI</i> y <i>BstII</i>
pCAMBIA1303-SISOS2	SISOS2, clonado en vector pCAMBIA1303 entre los sitios <i>Bgl II</i> y <i>Pml (BbrPI)</i>
pCAMBIA1303-SISOS3	SISOS3 clonado en vector pCAMBIA1303 entre los sitios <i>NcoI</i> y <i>Pml (BbrPI)</i>

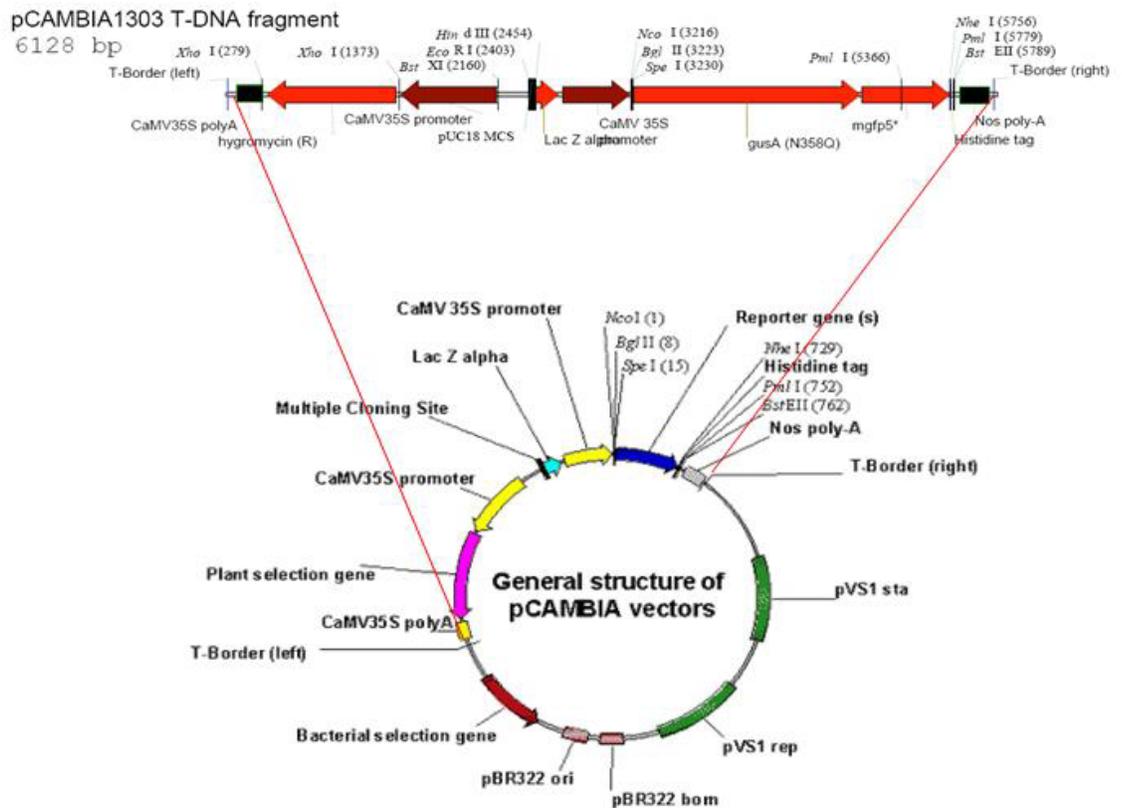


Figura M5. Representación esquemática del vector *pCAMBIA1303*

M.6.2. Cultivo de Arabidopsis

Para llevar a cabo ensayos funcionales en *Arabidopsis*, se han utilizado semillas de tipo silvestre, ecotipo Columbia Col-0 y de las líneas mutantes *sos1-1*, *sos2-2*, y *sos3-1*, cedidas por el Dr JM Pardo, IRNASE, CSIC, Sevilla.

M.6.2.1. Esterilización de semillas y germinación

La esterilización de las semillas se llevó a cabo en cámara de flujo laminar, añadiendo 1mL de etanol al 70% (v/v) a un tubo eppendorf de 1.5 mL con semillas (20 mg son aproximadamente 1000 semillas) y posterior agitación durante 1 min. Una vez retirado el alcohol, se añadió 1 mL de una mezcla de lejía al 70% con Tween-20 al 2.5 % (v/v), manteniéndose en agitación durante 5 min. Tras 3 lavados con agua destilada estéril, se añadió 1 mL más de agua destilada estéril que contenía bien, 0.2 % de agarosa para facilitar la siembra en placa en el medio de cultivo (medio de selección), o bien utilizando una pipeta Pasteur estéril para colocar una a una sobre la placa.

M.6.2.2. Cultivo en maceta

Una vez sembradas sobre placas petri conteniendo medio estéril MS con agar al 0.8 % (p/v), pH 6.2, las semillas son vernalizadas durante 2-4 días en oscuridad a 4°C, y posteriormente transferidas a una cámara de cultivo, donde crecieron a 21°C/18°C, día/noche, iluminación de 122 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. En el caso de líneas transformantes, las semillas germinaron y crecieron durante 7 a 14 días en medio MS agar, con higromicina a una concentración final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabla M7. Solución de riego para *Arabidopsis*

Macronutrientes	[mM]
KNO ₃	5
KH ₂ PO ₄ 1M	2.5
Ca(NO ₃) ₂ 1M	2
MgSO ₄ 1M	2
Micronutrientes	[mM]

H ₃ BO ₃ 0.5M	70
MnCl ₂ 0.5 M	14
CuSO ₄ 1M	5
ZnSO ₄ 0.5M	1
Na ₂ MoO ₄ 0.1 M	0.2
NaCl 5M	10
CoCl ₂ 0.1M	0.01
Fe-EDTA	2.5

Tras 7 a 14 días desde el inicio de la siembra, las plántulas de *Arabidopsis* se pasaron a semilleros con una mezcla al 50% de turba/vermiculita (estéril) en cámara de cultivo bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, donde crecieron hasta la floración y posterior producción de silicuas con las semillas. La autofecundación se forzó poniendo aracones de plástico antes de la floración, para aislar cada planta de su entorno. Las plantas se regaron cada 2 días con solución de riego de *Arabidopsis* (**Tabla M7**).

M.6.3. Transformación de *Arabidopsis* por *A. tumefaciens*

La transformación de *Arabidopsis* se llevó a cabo por el método de la inmersión floral de Clough y Bent (1998), revisado en Zhang et al (2006). Se sembraron directamente unas 50-100 semillas de *Arabidopsis* de las líneas mutantes *sos1-1*, *sos2-2*, y *sos3-1* y silvestre (ecotipo Columbia gl-0) en macetas con una mezcla al 50% de turba/vermiculita (estéril). Tras un periodo de vernalización de 2 a 4 días a 4°C, las plantas crecieron como se ha descrito más arriba hasta la aparición del tallo floral (aproximadamente un mes), momento en que las plantas están listas para la transformación por agroinfiltración. Para aumentar el número de primordios seminales y así la eficacia de transformación se eliminaron los primeros tallos florales promoviendo el desarrollo de más tallos desde la roseta. La agroinfiltración se realizó sumergiendo los tallos florales en una solución de agrobacterium, previa eliminación de todas las flores abiertas, semiabiertas y las silicuas. Tres días antes de la infiltración se inoculó una colonia de *A. tumefaciens* en un tubo estéril con 10 mL de medio LB, que contenía kanamicina, gentamicina y rifampicina, y creció a 28°C en agitación (200 rpm) durante 24 h.

Tras este periodo se transfirió 4 mL de este precultivo a un volumen de 200 mL del mismo medio, dejando crecer, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1.2-1.6. Las bacterias se sedimentaron a 4800 rpm (rotor GSA, Sorvall) durante 10 min a 4°C y se

resuspendieron a una DO_{600} de ~ 0.8 en un volumen de solución de infiltración que contenía medio MS, 2.2 g L^{-1} ; MES 0.1 g L^{-1} , sacarosa 5 % (p/v), 0.5 mg L^{-1} de vitamina B5, $0.044 \text{ }\mu\text{M}$ (preparado en NaOH 1N), ajustándose el pH a 5.9 con NaOH. Una vez que las células son resuspendidas se añadió Silwet L-77 al 0.03% (v/v) (Lehle Seeds), detergente que favorecerá la apertura de los estomas en el proceso de infiltración. El medio de infiltración se vertió en un recipiente de diámetro de boca ligeramente mayor al diámetro superior de la maceta, con el fin de que la parte aérea de la planta entre en contacto con la solución por un simple volcado de aquélla. Para evitar que la turba/vermiculita caiga en la solución, ésta se cubrió con parafilm. Después de una inmersión de la parte aérea durante 1 min, la maceta se retiró y se drenó el exceso de solución de infiltración apoyando la planta sobre un poco de papel de filtro. La maceta se cubrió con una bolsa de plástico y se dejó tumbada durante 24 h, tras lo cual se retiró la bolsa y las plantas permanecieron en la cámara de cultivo hasta la recolección de semillas.

M.6.4. Selección de transformantes

Las semillas procedentes de plantas transformadas son esterilizadas, germinadas y crecidas como se describe en el apartado **M.7.2** en placas Petri sobre medio de germinación MS conteniendo el antibiótico de selección ($50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ higromicina). Las plántulas resistentes son traspasadas a turba/vermiculita tras 2 semanas de crecimiento originando cada una de ellas una línea transformante, y en conjunto la primera generación de transformantes F1.

M.6.5. Test de segregación y obtención de líneas homocigotas

Las diferentes líneas pasadas a turba/vermiculita se sometieron a autofecundación para producir la segunda generación de transformantes (F2). Para confirmar la existencia de un único lugar de inserción, la segunda generación de semillas de cada línea (100 semillas) se sometió a crecimiento en medio MS con higromicina. Aquellas líneas que superaran el 75% de supervivencia en antibiótico indicaban que había más de un *locus* de inserción. Unas 12 plantas de cada línea de la F2 resistentes con inserción única se pasaron a turba/vermiculita y fueron sometidas a autofecundación para dar lugar a la tercera generación (F3). La proporción de semillas resistentes en la F3 nos permitió conocer la condición homocigota/heterocigota de la planta originaria.

El análisis del fenotipo se llevó cabo utilizando semillas de la F3. Las semillas germinaron y crecieron en medio MS-agar. Después de 4 días, las plantas se transfirieron a medio MS que contenía 75 mM de NaCl, creciendo en posición vertical durante 12-14 días, tras lo cual se procedió a la medida de la longitud de la raíz. Además, dado que durante este tiempo aparecen raíces secundarias, para asegurar la significación de estos datos se procedió a determinar el peso fresco de las plántulas empleadas en estos ensayos.

M.7. Genética reversa en tomate mediante silenciamiento génico de SISOS1 (RNAi)

Para evaluar el papel que juega *SISOS1* en el transporte de Na⁺ a larga distancia y su papel en la tolerancia del tomate a la salinidad se han generado plantas transgénicas con reducción de función por silenciamiento génico postranscripcional (PTGS - *postranscriptional gene silencing*-). (Chuang y Meyerowitz 2000). Esta técnica de RNA de interferencia se ha ensayado con éxito en varias especies incluidas *Arabidopsis* y tomate (Guo et al. 2002, Waterhouse y Helliwell, 2003, Davuluri et al. 2004).

Para un eficiente PTGS, la construcción génica a transformar debe de codificar un fragmento del gen en sentido y antisentido, separado por un intrón que da lugar a una estructura del RNA en doble cadena complementaria de sí misma con *splicing* final del intrón durante el procesado del pre-mRNA (*hairpin-dsRNA*) (Smith et al. 2000) (**Figs. A13 y A14**). Para ello se han utilizado los vectores plasmídicos pKANNIBAL/pART27 para expresar en la planta un hpARN de doble cadena, derivada del gen a silenciar (Wesley et al. 2001). La obtención de plantas transgénicas se llevó a cabo transformando cotiledones de tomate (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker), mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, cepa LBA4404.

M.7.1. Construcciones génicas *ihpRNA*

La construcción para el silenciamiento del gen *SISOS1*, se obtuvo mediante la clonación de un fragmento de PCR de 459pb, que codifica 156 aminoácidos de la región central del extremo C-terminal (aminoácidos 763-918, **Fig. R1**) utilizando el cebador directo, S1BXFi (que contiene sitios *BamHI* y *XhoI*) y el reverso, S1HERi (que contiene sitios *HindIII* y *EcoRI*) (**Tabla M4**) en orientación sentido y antisentido (**Fig. M6**). El

clonado del producto de PCR en sentido se llevó a cabo unidireccionalmente por los sitios *XhoI-EcoRI*, previa digestión del fragmento y el plásmido con ambas enzimas y finalmente ligado al vector pKANNIBAL. La copia antisentido se introdujo posteriormente digiriendo el producto de PCR con *HindIII* y *BamHI* y ligándolo a los sitios respectivos de pKANNIBAL.

Las construcción realizada en pKANNIBAL se subclonó como un fragmento *NotI*, que comprendía todo el *cassette* de expresión, en el vector binario de expresión de plantas pART27 (Gleave 1992), bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S* y que incluía un gen de resistencia a kanamicina dentro del ADN-T. Finalmente el vector con la construcción de silenciamiento se introdujo en *Agrobacterium*, cepa LBA4404 (apartado M.1.1.4.2).

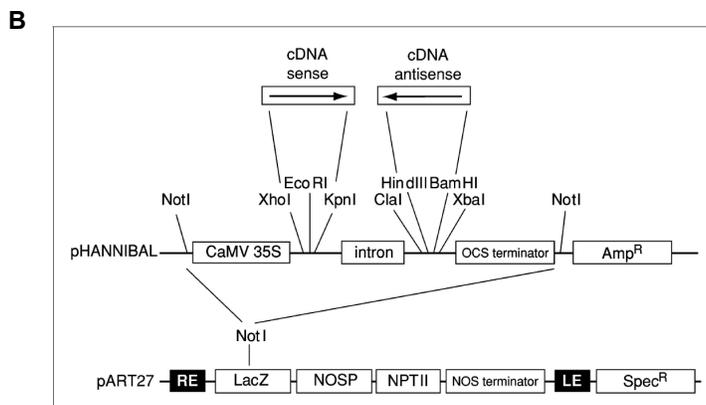
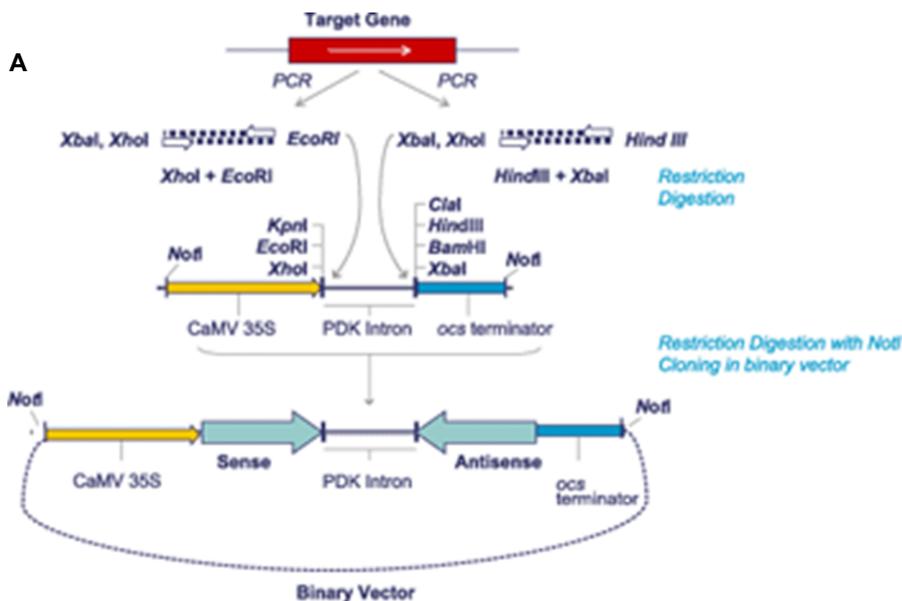


Fig M6: Estructura del *pKANNIBAL/pHANIBAL*. A. Procedimiento para elaborar la construcción de silenciamiento con la estructura “intron hairpinRNAi” en el plásmido *pKANNIBAL*. B. Subclonado de la construcción de silenciamiento en el vector binario *pART27*.

M.7.2. Transformación de cotiledones de tomate

Para la transformación se utilizaron cotiledones de plántulas de tomate *S. lycopersicum* de cv. Moneymaker germinadas *in vitro* (**apartado M.1.3.1.5**). Después de 8 a 10 días desde la germinación de la semilla, y antes de que salga ninguna hoja primaria, los cotiledones expandidos se aislaron y se utilizaron para los experimentos de transformación, siguiendo básicamente el método descrito por Ellul et al. (2003). Todo el procedimiento seguido se ilustra en la **Figura R20**. Los cotiledones obtenidos se separaron del resto de la plántula de tomate, y se seccionaron transversalmente en dos segmentos. Cada segmento se incubó en medio de precultivo (PCM) situando la parte adaxial del cotiledón en contacto con el medio, y a razón de 24 fragmentos por placa de petri (**Tabla M8**). Después de dos días de precultivo en oscuridad se llevó a cabo el co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404, portando el plásmido binario *pART27* con la construcción de silenciamiento de *SISOSI* (**apartado M.7.1**).

El cultivo del *Agrobacterium* transformado se inoculó en medio LB suplementado con rifampicina ($50\mu\text{g L}^{-1}$), estreptomycin ($30\mu\text{g L}^{-1}$) y espectinomycin ($50\mu\text{g L}^{-1}$), durante toda la noche, a 28°C y con una agitación de 190 rpm. Tras alcanzar una DO_{600} de 0.4-0.6, el cultivo de *Agrobacterium* se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min (rotor GSA, Sorvall), obteniéndose un sedimento bacteriano que se resuspendió en medio de co-cultivo (CCM) desprovisto de agar y suplementado con $200\mu\text{M}$ de acetosiringona, a fin de favorecer la infección de los cotiledones. Al cultivo de *Agrobacterium* en CCM se le adicionaron entonces los segmentos de cotiledones previamente incubados en medio PCM, a razón de 24 fragmentos de cotiledón por 30 mL de cultivo bacteriano y el conjunto se incubó durante 20 min, a 26°C y en agitación de 190 rpm. Trascorrido este tiempo, los cotiledones se recogieron por filtración y se secaron cuidadosamente entre láminas de papel de filtro estéril, con el fin de eliminar las bacterias que pudieran haber quedado adheridas a la superficie de los cotiledones.

Los explantos se transfirieron entonces a placas de Petri conteniendo CCM sólido (**Tabla M8**), donde se incubaron 2 días en oscuridad, a 26°C . Tras este tiempo, se llevó a cabo el lavado de los cotiledones en solución de lavado WM (**Tabla M8**). Después de dos lavados de 15 min a temperatura ambiente, los fragmentos de cotiledones se

filtraron, se secaron con papel de filtro estéril y se transfirieron primeramente a medio de caulogénesis y posteriormente a medio de rizogénesis a fin de regenerar plantas completas.

M.7.3. Regeneración de plantas a partir de los cotiledones transformados

Para inducir la formación de tallos, los fragmentos de cotiledón cocultivados con *Agrobacterium* se incubaron en medio de inducción de tallo no selectivo (*shoot induction médium*, SIM-NS) (Tabla M8) durante 48 horas, a 24°C, bajo iluminación de 120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) y, posteriormente, en medio selectivo, en presencia de kanamicina, SIM-K (Tabla M8) en las condiciones de luz y temperatura anteriores.

Tabla M8 Composición de los medios de cultivo usados en los experimentos de transformación de cotiledones de tomate y regeneración de plantas a partir de los cotiledones transformados (Ellul et al. 2003). Las cantidades modificadas están referidas a un litro de medio. * Vitaminas SH (Shahin 1985), NS: no selectivo, K: selectivo, IAA: ácido indolacético.

	GM	PCM	CCM	WM	SIM-NS*	SIM-K*	RM-K*
Macro y micronutrientes (MS)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Sacarosa (g)	10	30	30	20	30	30	20
Myo-inositol (mg)	-	100	100	100	100	100	100
Vitaminas SH* (mL)	-	10	10	-	10	10	-
IAA (mg)	-	4	4	-	4	4	0.1
Kinetina (mg)	-	4	4	-	4	4	-
Zeatina (mg)	-	-	-	-	1	1	-
Kanamicina (mg)	-	-	-	-	-	50	50
Acetosiringona (μM)	-	-	200	-	-	-	-
Agar (g)	8	8	8	-	8	8	8

Los explantos se subcultivaron cada tres semanas en el medio SIM-K hasta que los brotes alcanzaron un tamaño de aproximadamente 2 cm, momento en el que se transfirieron individualmente a recipientes de vidrio de cultivo *in vitro* conteniendo medio de inducción de raíces RM-K (**Tabla M8**), a fin de promover la formación de raíces. Tras el enraizamiento, las plántulas se transfirieron a semilleros, dentro de micropropagadores para mantener la alta humedad relativa, que contenían una mezcla de turba/vermiculita (1:1) previamente esterilizada, y cuando alcanzaron un porte adecuado, se pasaron a macetas de 5 litros conteniendo turba estéril.

M.7.4. Selección de transformantes y propagación

Cada una de las plantas regeneradas y transferidas a macetas se identificó como una línea transformante primaria independiente o planta F0, originada a partir de un evento individual de transformación, y se identificó con un único número (P.e.: Línea 1, Línea 2, Línea 3). Las plantas obtenidas al germinar las semillas de plantas F0, se consideraron como primera generación segregante o plantas F1.

Las semillas transgénicas (F1) se germinaron *in vitro* con medio GM suplementado con 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Kanamicina (**apartado M.1.3.1.5**). A los 5-8 días desde la germinación se seleccionaron las plántulas que presentaban clara resistencia al antibiótico (verdes con raíces largas). Cuando las plántulas hubieron desarrollado 3-4 hojas verdaderas se transplantaron en macetas y se cultivaron hasta la recolección de sus semillas. Así mismo, las plantas obtenidas por germinación de semillas de líneas F1, fueron consideradas como segunda generación o plantas F2.

M.7.5. Detección de las líneas transformantes por PCR

La identificación positiva de las líneas transformantes se llevó a cabo mediante comprobación por PCR de la presencia de la construcción de silenciamiento en plantas transformadas, utilizando ADN genómico de plantas extraído de distintas líneas transformadas F0 y de la línea control (**apartado M.3.1.**), y una pareja de cebadores (FNPTII-RNTPII, **Tabla M4**) que anidan en el casete de expresión de pART27, que amplificaba una banda de 665 pb.

M.7.6. Análisis de la expresión génica en las líneas silenciadas

El método utilizado para detectar diferencias cuantitativas en la expresión del gen silenciado en distintas condiciones fue la técnica de RT-PCR semicuantitativa, (**apartado M.4.6.**). Para el análisis de la expresión de *SISOS1* se emplearon cebadores que amplificaban un fragmento de 926pb, uno de los cuales es el mismo cebador reverso utilizado para la construcción de ARNi, S1HERi y uno directo, 3F2.5, cuya secuencia no estaba presente en el fragmento de dicha construcción (**Tabla M4**). Como control interno se eligió un ARNm abundante en la célula y reactivamente invariable (el factor de elongación de tomate, (ef1- α), que da un fragmento de ADN de 366 pb utilizando los cebadores FEF1 y REF1 (**Tabla M4, apartado M.4.6.**).

El ARN total de hojas, tallos y raíces de las líneas transformantes F0 positivas y de la no transformada se extrajo mediante el *kit RNeasy Minikit* de Qiagen (**apartado M.4.1.**) tras 3 semanas de cultivo en medio hidropónico con solución nutritiva 1/4x de Hoagland (**apartado M.1.3.1.4**). Asimismo, se analizó la expresión génica en función de la salinidad del medio de cultivo en las líneas F1 heterocigóticas. En este caso se extrajo ARN total de los diferentes tejidos de las líneas silenciadas y no transformadas, cultivadas en solución nutritiva 1/4x de Hoagland y sometida posteriormente a un tratamiento de 5 días con 0 y 100 mM NaCl. (**apartado M.1.3.1.4**).

M.7.7. Evaluación del fenotipo de los transformantes con supresión de *SISOS1*

El análisis fenotípico de los transformantes se llevó a cabo en las líneas silenciadas de la F1 y posteriormente, en las de la F2. Las plantas se cultivaron como se describe en el **apartado M.1.3.1.4**, y se trataron con 0 y 100mM de NaCl los últimos 5 días de cultivo. Para el análisis de la expresión génica de las plantas transformadas, muestras de 1-2 g de hojas, tallos y raíces correspondientes a 6 plantas por maceta y 2 macetas por tratamiento, se recogieron a diferentes tiempos, usualmente 1, 3 y 5 días. En el caso de las raíces previamente se realizaron 4 lavados con agua desionizada y se secaron. Finalmente se congelaron inmediatamente en N₂ líquido, y se almacenaron a -80°C, procediendo como se describe en los **apartados M.7.6.** y **M.4.5.5.**. El resto de material, se pesó para la determinación del peso fresco. Para la obtención del peso seco (PS), cada muestra de tejido se secó en estufa a 70°C durante 48 horas. Para el análisis

mineral se prepararon muestras secas (0.2 g por muestra) que fueron trituradas con un molinillo de café hasta conseguir un polvo fino. El contenido de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , se determinó por espectrometría ICP (*Inductively Coupled Plasma Spectrometry*, Iris Intrepid II; Thermo Electron Corporation, Franklin, MA, USA, Servicio de Ionómica, CEBAS-CSIC; Murcia; España), previa digestión de las muestras secas en una solución $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (2:1, v/v) en horno microondas.

La velocidad relativa de crecimiento (RGR *-relative growth rate-*) se calculó usando la ecuación siguiente (Guerrier 1996):

$$\text{RGR} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

donde W_1 y W_2 son el peso fresco total de la cosecha a tiempo 1 y 2, respectivamente.

La velocidad de absorción neta (NUR, *-net uptake rate-*) de Na^+ y K^+ en planta entera se calculó como se describe en Guerrier (1996):

$$\text{NUR} = [(M_2 - M_1) / (t_2 - t_1)] \times [(\ln R_{w2} - \ln R_{w1}) / (R_{w2} - R_{w1})] \quad (2)$$

donde M_1 y M_2 son el contenido de Na^+ y K^+ en la planta entera a la cosecha 1 y 2, respectivamente, $t_2 - t_1$ es el intervalo de tiempo entre cosechas y R_w es el peso seco de raíz a cada cosecha.

Para el cálculo de la velocidad neta de translocación de raíces a parte aérea (NTR, *-net translocation rate-*), el contenido de Na^+ y K^+ en la planta entera (M_1 y M_2 en ecuación 2) se sustituyeron por sus contenidos en tallos u hojas. Los flujos a órganos individuales se calcularon por la ecuación (2) donde M es el contenido de Na^+ y K^+ en el órgano y R_w el peso seco del órgano en consideración.

La savia xilemática se colectó como exudados de la raíz después de la decapitación de la parte aérea de las plantas cultivadas en hidropónico como se describe en Navarro et al. (2003). Brevemente, las plantas se decapitaron por encima de la raíz, dejando la base del tallo, en el cual se insertó un tubo de silicona de 10 cm, sellado sobre el tallo con grasa de silicona. El primer exudado de savia xilemática, 10 min después de la decapitación, se desechó para prevenir la contaminación de la savia con el contenido de células dañadas o con savia floemática. El volumen de savia xilemática que emergió después se colectó en función del tiempo entre 10 y 60 min. La savia fluyó libremente en plantas no tratadas y tratadas con 25 mM de NaCl después de 3 días de tratamiento, y tan solo se colectaron unos pocos μL después de 1 día de tratamiento con 100 mM de NaCl, y nada posteriormente. Las raíces se colectaron, lavaron y pesaron para la determinación del peso fresco. El flujo de savia se expresó como $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF de raíz.

La concentración de Na^+ , K^+ se determinó por espectrometría ICP (Servicio Ionómica, CEBAS-CSIC; Murcia; España). Los flujos de Na^+ y K^+ en la savia xilemática se estimó como el producto de la concentración de iones por el flujo xilemático, expresado como $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF de raíz.

M.7.8. Purificación de vesículas de membrana plasmática

El aislamiento de fracciones microsomales de raíces de plantas adultas silenciadas y no silenciadas tratadas durante 3 días con 100 mM de NaCl, se llevó a cabo como se describe en Ballesteros et al. (1998). Entre 50-100 g de peso fresco de tejido se lavaron con agua desionizada, secándose por centrifugación manual entre papeles de filtro con secadora de verduras. Todo el proceso posterior se llevó a cabo a 4°C. Las raíces se trocearon y se homogeneizaron en Sorvall Omnimixer con un medio de homogenización (1:2, peso fresco/volumen) tamponado a pH 8.0 con ácido sulfúrico, conteniendo 25 mM BTP, 0.2 % (p/v) BSA, 250 mM manitol, 2 mM MgCl_2 , 2 mM de EGTA-BTP, pH 7.5, 10 % (v/v) glicerol, 2.5 % (p/v) PVP-40, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, y 5 mM metabisulfito sódico. El homogenado se filtró a través de 6 capas de gasa, y el extracto obtenido se centrifugó a 12000 g durante 15 min, (centrífuga Sorvall, rotor SS34). El sobrenadante se centrifugó durante 45 minutos a 100000 g (centrífuga Beckman, rotor 60Ti). El sedimento obtenido se resuspendió en 2 mL de tampón de partición, para el aislamiento del plasmalema por partición de fases, y que contenía 330 mM sacarosa, 5 mM fosfato potásico, pH 7.8, y 0.1 mM PMSF. Estas preparaciones microsomales se usaron inmediatamente o se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C, para su uso posterior.

A partir de estas fracciones microsomales se obtuvieron preparaciones enriquecidas en vesículas de membrana plasmática, por el método de partición de fases en sistemas de dos polímeros acuosos de PEG y dextrano, siguiendo el protocolo descrito por Buckhout et al. (1988), para raíz. Una partición conteniendo 20 g de fase fue suficiente para purificar las vesículas de plasmalema de raíz. Los tubos de partición contenían 6.4 % (p/p) Dextrano T500 (Pharmacia), 6.4 % (p/p) PEG 3350 (Sigma-Aldrich Química, Spain), 2 mM KCl, 330 mM sacarosa y 5 mM tampón fosfato potásico, pH 7.8. Tras la adición al tubo de partición de 2 mL de membranas microsomales resuspendidas en tampón de partición, las fases se mezclaron vigorosamente por 40 inversiones del tubo y

se separaron por centrifugación a 2000 g durante 5 minutos en rotor basculante (centrífuga de mesa, Martin Christ). La fase superior obtenida, conteniendo las vesículas de membrana enriquecidas en plasmalema, se diluyó con tampón de lavado que contenía 250 mM manitol, 2 mM BTP-MES, pH 7.5, 1 mM EGTA-BTP pH 7.5, 2 mM DTT y 0.1 mM PMSF, sedimentándose por centrifugación a 150000 g durante 45 minutos (centrífuga Beckman, rotor 60Ti). El sedimento enriquecido en plasmalema se resuspendió en tampón de lavado al que añadió 0.2 % (p/v) BSA, una vez tomadas las alícuotas para la determinación de su contenido protéico (Gostad y Krutness, 1982). Las membranas se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron en alícuotas de 20 µl a -80 °C para su uso posterior.

M.7.9. Medida de la actividad antiportadora Na⁺/H⁺

La detección del intercambio Na⁺/H⁺ en las vesículas aisladas se llevó a cabo midiendo la disipación por Na⁺ del gradiente de H⁺ previamente creado por la acción del enzima H⁺-ATPasa de plasmalema, utilizando ACMA como sonda fluorescente (Blumwald et al. 1987), con modificaciones (Ballesteros et al. 1997). La fluorescencia de la sonda ACMA, disuelta en DMSO, se cuantificó en un espectrofluorímetro termostatzado y con agitación (modelo QM2000; Photon Technology International, Sussex, UK), a una longitud de onda de excitación y emisión de 415 and 485nm, respectivamente.

La formación del gradiente de pH se llevó a cabo incubando 50 µg de proteínas de membranas de plasmalema en un medio conteniendo 250 mM manitol, 10 mM BTP-MES, pH 7.5, 1.5 mM ATP-BTP, pH 7.0, 100 mM TMA-Cl, 1 µM ACMA, 25 mM KNO₃, iniciándose la reacción por adición de 1.5 mM MgSO₄ (**Fig. R26**). En estas condiciones, el enzima H⁺-ATPasa de plasmalema, en presencia de Mg-ATP, y K⁺, provocó la extinción gradual de la fluorescencia de la sonda, lo que indicaba la formación de un gradiente de pH (interior ácido) (**Fig. R26, flecha 1**). A continuación, la adición de Na⁺ en forma de sulfato sódico, provocó la recuperación de la fluorescencia a consecuencia de acumulación activa de Na⁺ asociada a un eflujo pasivo de H⁺, catalizado por el antiporte Na⁺/H⁺ (**Fig. R26, flecha 2**). Finalmente, para la recuperación del valor inicial de fluorescencia, el gradiente se disipó por la adición de 1 µM del protonóforo gramicidina ó 10 mM NH₄SO₄ (**Fig. R26, flecha 3**). Para la cuantificación de la actividad antiporte Na⁺/H⁺ se calculó la tangente a la curva en los primeros segundos tras la adición de sal, y se calculó la velocidad inicial de

recuperación de la emisión de fluorescencia, como el resultado del cociente entre la fluorescencia recuperada por unidad de tiempo, siendo el 100% de la recuperación de la fluorescencia total la diferencia entre el máximo nivel de extinción en el estado estacionario y el nivel máximo de fluorescencia obtenido tras la adición de 10 mM NH_4SO_4 al final del ensayo, el cual disipa el gradiente de pH.

VI. Resultados

R.1. Aislamiento de los ORFs que codifican a los genes *SISOS*

R.1.1. *SISOS1*

R.1.1.1. Aislamiento y clonaje

Para la obtención de la secuencia completa de *SOS1* de tomate se llevaron a cabo tres estrategias. En primer lugar, se realizó una búsqueda de homólogos de *AtSOS1* en las bases de datos de secuencias ESTs de tomate (*NSF tomato genome project*, DBI-9872617, <http://www.tigr.org>; <http://www.sgn.cornell.edu>), revelando la existencia de secuencias ESTs de Solanáceas, entre éstas, 3 de tomate, una de las cuales presentaba una alta homología, 65% y 73 % de identidad en las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, respectivamente, con la parte C-terminal de *Arabidopsis*, justamente la más divergente filogenéticamente en esta familia de intercambiadores Na^+/H^+ (Shi et al. 2000). Sin embargo, dicho clon EST de tomate, suministrado por el Boyce Thomson Institute (BTI, Universidad de Cornell, NY, USA), no pudo ser secuenciado de nuevo, ya que la cepa bacteriana que lo portaba, no crecía.

Una segunda estrategia, fue el escrutinio mediante PCR con cebadores degenerados, DAB2p y RDAB6 (**Tabla M4**) que anidaban a regiones conservadas de la parte central de la secuencia aminoacídica de genes *SOS1* de plantas (**Fig. R3A**), junto con un par de cebadores de las secuencias de los respectivos vectores, utilizando como molde ADNc obtenido de sendas genotecas de cDNAs de tomate, una de ellas, de pelos radiculares, construida en λ ZAPII (cedida por el Dr. M. Bucher, ETH, Zurich), y otra de raíces construida en λ TriplEx2 (cedida por el Dr. David Walsh, SAC, Edimburgo). Dicha estrategia para conocer las regiones 5' y 3' adyacentes a la región central resultó infructuosa, ya que ninguna de las genotecas contenían el gen completo (aprox. de 3,5 kb), sino fragmentos parciales, que sin embargo sirvió para la siguiente estrategia (resultado no mostrado).

La última estrategia para aislar el gen *SOS1* de tomate consistió en el aislamiento de un fragmento del gen mediante la técnica de RT-PCR, usando los cebadores degenerados mencionados anteriormente, a partir de RNA total de tejidos tratados con NaCl o de ADNc aislado de las genotecas anteriormente mencionadas, seguido de la obtención de ADNc de tamaño completo por RACE-5'3' usando el *SmartTM 5'-3' RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech, BD Biosciences) (**apartado M.4.4.**). El procedimiento

detallado se describe a continuación. Mediante amplificación por RT-PCR, utilizando como molde 5 µg de ARN total de tallo de tomate (*S. lycopersicum* cv. Pera) o ADNc de las genotecas y los cebadores degenerados, se obtuvo un fragmento parcial de ADNc (1.2 Kpb) (**Fig. R1A**) correspondiente a la región central del gen putativo de tomate (**Fig. R3A**). Tras la secuenciación directa del fragmento, se diseñaron cebadores específicos, GSP2-239 (directo) y GSP1-604 (reverso) (**Tabla M4**), para amplificar el ORF completo, mediante RACE-5'-3', En la reacción de RACE-3'-RT y PCR subsiguiente con cebadores GSP2-239 (directo) y UPM (reverso), se obtuvo un fragmento de 2.5 kb (**Fig. R1B**), que fue subclonado en p-GEM-T. Tras la secuenciación completa del mismo con cebadores del vector y cebadores internos, reveló la secuencia de la región C-terminal, incluyendo el extremo 3' no traducido.

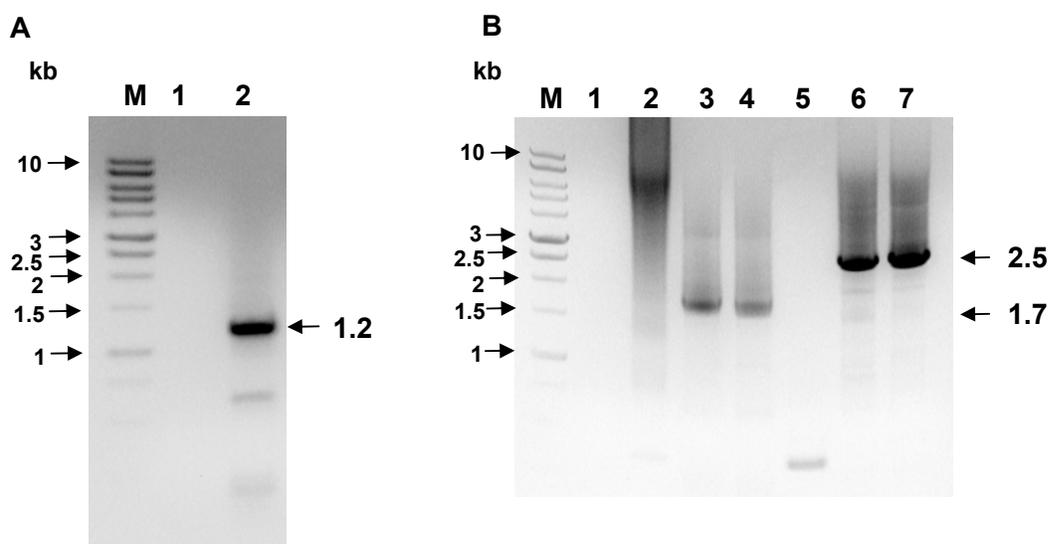


Figure R1. A. Aislamiento de un fragmento central de 1.2kb por RT-PCR a partir de ARN total de tallo, correspondiente a SISOS1. M, marcador, 1, reacción de RT sin molde de ARN (blanco), 2, reacción de RT con molde. La reacción de RT se llevó a cabo como en apartado M.4.3. Las condiciones de PCR fueron 94°C/3min, 35x[94°C/30s, 55°C/45s, 72°C/1.5 min], 72°C/5min y 4°C. **B.** Reacciones de RACE-5'3'. M, marcador; 1,5, blancos sin molde; 2,3,4, reacciones de RACE-5'; 6,7, reacciones de RACE-3' con molde ARN total. La reacción de RT se llevó a cabo en apartado M.4.4. Las condiciones de PCR fueron como en Tabla M5.

Con la reacción de RACE 5'-RT, y PCR subsiguiente con UPM (directo) y GSP1-604 (reverso) se obtuvo un fragmento de ADNc de 1.7 kbp del extremo 5' (**Fig. R1B**), siendo necesarias dos rondas sucesivas de PCR con este molde para ir caminando sobre la

secuencia del extremo 5', con dos nuevos cebadores reversos adicionales 5R1.7 y 5R2-1.7 (**Tabla M4**), hasta llegar a la secuencia que contenía el codón de inicio.

Finalmente, el ORF completo de *SISOS1* se amplificó por PCR con la *JumpStartTM Accutaq LA DNA polymerase mix*, utilizando como molde una alícuota de la reacción de RACE-5'-RT y los cebadores S1FXba2 y S1RSal2, que contenían un sitio *XbaI* y *Sall*, respectivamente, para ser clonado directamente, de forma unidireccional, en el sitio *Xba-Sall* del vector multicopia de levadura pYPGE15, bajo control del promotor *PGK1* (**Fig. R2**), previa digestión del fragmento y del plásmido con ambas enzimas.

La secuencia de *SISOS1* se depositó en la base de datos de genes del GenBank/EMBL con el número de accesoión AJ717346.

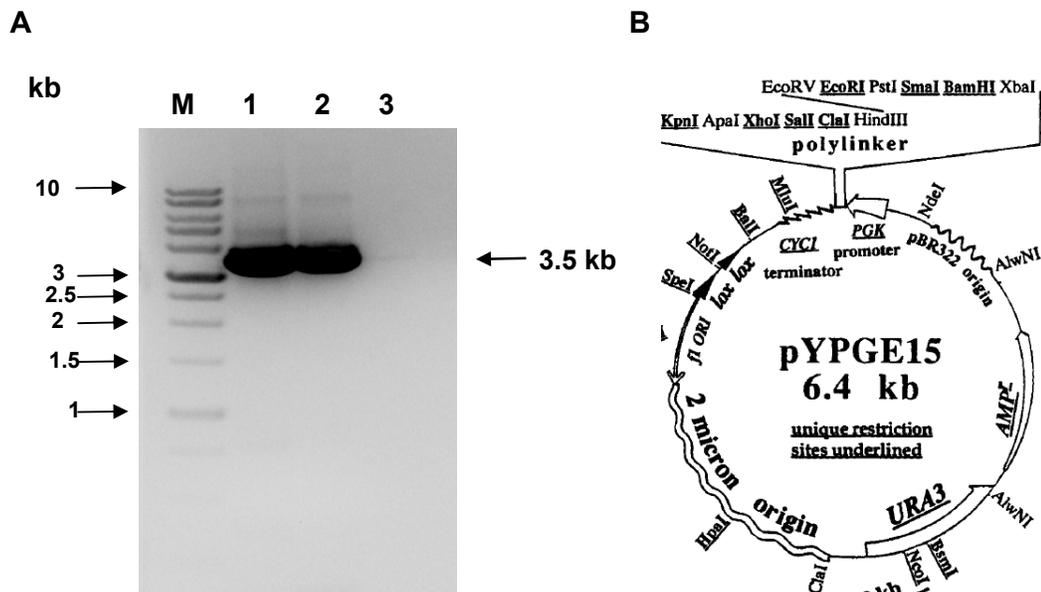


Figure R2. A. Aislamiento por PCR del fragmento de 3.5 kb conteniendo el ORF completo de *SISOS1* utilizando como molde la reacción de RACE-5'-RT y cebadores S1FXba2 y S1RSal2. M, marcador, 1 y 2, reacciones de RACE-5'-RT; 3, blanco sin molde. La reacción de RT se llevó a cabo como en **apartado M.4.4.** Las condiciones de PCR fueron 94°C/3min, 35x[94°C/30s, 53°C/45s, 72°C/3.5 min], 72°C/7min y 4°C. B. Estructura del plásmido pYPGE15 (Brunelli y Pall 1993).

R.1.1.2. Análisis de la secuencia de *SISOS1*

El marco abierto de lectura (ORF) de *SISOS1* está formado por 3456 pb que codifica una proteína de 1151 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 127,457 Da

(Fig. R3A). En una búsqueda reciente de homólogos de *AtSOS1* en las bases de datos de genes se han identificado hasta 23 secuencias altamente homólogas a *SOS1* y más de cien secuencias ESTs de diferentes especies, indicando su distribución ubicua en plantas (Pardo et al 2006; Protein Knowledgebase, UniProtKB/TrEMBL, <http://beta.uniprot.org>). El alineamiento de SISOS1 con múltiples secuencias proteicas de *SOS1* conocidas de plantas, mostró un alto grado de homología con especies de dicotiledóneas, como *Populus euphratica* (68.2%) *Suaeda japonica* (64.4%) o *Arabidopsis* (62.7%), un poco menos con especies de monocotiledóneas como *Phragmites australis* (61.7%) *Oryza sativa* (60.9%), *Triticum aestivum* (59.5%), o de plantas marinas como *Cymodocea nodosa* (57%) para CnSOS1.A, y 63% para CnSOS1B), y mucho menos en comparación con el musgo *Physcomitrella patens* (48.8%) (Fig. R3B).

Como predice el programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk>), la proteína contiene 12 dominios transmembrana y un largo extremo C-terminal, típico de *SOS1* de plantas (Fig. R3A) (Pardo et al 2006). Asimismo, se predicen muchos sitios de fosforilación, la mayoría en el extremo C-terminal (Oh et al 2007). Sin embargo, el análisis fosfoproteómico de la proteína *AtSOS1* identificó sin ambigüedad solo dos sitios específicos de fosforilación en la Ser¹¹²¹ y Ser¹¹²² (Hem et al 2007), y ambiguamente, en la Ser¹⁰⁵² (Nühse et al 2004). Todos estos residuos están conservados en la secuencia de la proteína SISOS1, que podrían ser blanco de la fosforilación del antiportador Na⁺/H⁺ *SOS1* por el complejo quinasa SOS2/SOS3 (Qiu et al. 2002, Shi et al. 2002, Quintero et al. 2002). Asimismo, se ha identificado dos dominios conservados que también están presentes en todas las proteínas *SOS1*. Un dominio de intercambio Na⁺/H⁺ que abarca completamente el dominio transmembrana, desde los aminoácidos 27 al 443 (IPR006153, UniProtKB/TrEMBL, <http://beta.uniprot.org>), y un dominio de ligamiento a nucleótidos cíclicos situado centralmente en el largo dominio C-terminal, desde los aminoácidos 753 al 843 (IPR000595). El análisis mediante *Southern-blot* con una sonda de 300 pb de la zona C-terminal reveló que el tomate contiene una sola copia de *SOS1* (Fig. R3C).

A

			TM1	TM2	
AtSOS1	(1)	MTTVIDATMAYRELEPATSSSSSSSSKLESSPVLAIVFVGMSLVGLIASRHLLRGRTRVPYTVALLVIGIALGSLLEYGAK			
S1SOS1	(1)	-MELLIVETRFRRIVEESISAESS-----LFTNAVIFVGLSLGLIGCRHLLRGRTRVPYSVALLVIGILGALLEYGTH			
			TM3	TM4	
AtSOS1	(81)	HNLGKIGHGIRIWNEDPPELLLAVPLPALLFESSFSMEVHQIKRCLGQVLLAVPGVLISLACLGSLKVVTFPYEWLWKT			
S1SOS1	(72)	HGLGRIGDGIRIWANIDPOLLVAVSF PALLFESAFSMEVHQIKRCAVQMLLVAEPGVLISLTFGLGAAIKLAFPYNWSWT			
			TM5	TM6	
AtSOS1	(161)	SLLGGLLSATDPVAVVALLKELGASKKLSITIEGESLMNDGTAIVVQLEFLKMMQNSDWSSTIKFLLKVALGAVGIG			
S1SOS1	(152)	SLLGGLLSATDPVAVVALLKELGASKKLSITIEGESLMNDGTAIVVQLEFLRMVTGWTFFNWSAVIKFLVQVSLGAVGFG			
			TM7	TM8	
AtSOS1	(241)	LAFGIASVTLWLFIFNDTVIEITLTLAVSYBAYYTAQEWAGASGVLTVMTLGMFYAABARTAFKGDSSKSLHHFEMVAY			
S1SOS1	(232)	LAFGIASVTLWLFIFNDTVIEITLTLAVSYVAYFTAQCGADVSGVLTVMTLGMFYAVAKTAFKGESHCQLHHFEMVSY			
			TM9	TM10	TM11
AtSOS1	(321)	IANTLIFILSGVVIAEGILDSKTIAYQGN-SWRFLELLVYVITQLSRVVVVGVLYPLLCRFYGYGLDKKESHILVWSGLRGA			
S1SOS1	(312)	IANTLIFILSGVVIAEGILAGDNIFKIYDNSVYLLVLLVYVITQLSRVVVVGVLYPLLCRFYGYGLDKKESHILVWSGLRGA			
			TM12		
AtSOS1	(400)	VALALSLSVKQS-SGNSHISKETGTLFLEETGGIVFLTLVNGSTTQVLRLLSMDLLEAFKKRILEYTKYEMLNKALPA			
S1SOS1	(392)	VALALSLSVKRSDGSOYISSDTGTLFVFLTGGVVFLLVNGSTTQVLRLLSMDLLEAFKKRILEYTKYEMLNKALEA			
AtSOS1	(479)	FQDLGDDEELGPADWPVTSYISLKGSEGEVHHPHNGSKIGSLDPKSLRDIRMRELNGVQAAYWEMLEGRITSEVTAN			
S1SOS1	(472)	FQDLGDDEELGPADWPVKRYIISLNDVGEGEVHHPHTSSGNDNVDHMHLEDIRIRLNGVQAAYWEMLEGRITSEVTIAN			
AtSOS1	(559)	ILMQSVEANDQVSTT-LCDWRGLKEHVNFPNYYNFLSKVVERKLVTYFAVERLESACYISAAFLRAHTARQQLDFL			
S1SOS1	(552)	ILMQSVEANDQVSHPELDCWRGLKSYVNIIPNYYNFLSKVVERKLVTYFAVERLESACYICAGFLRAHTARQQLDFEFL			
AtSOS1	(638)	GESNIQSIVINESEKEGEEARKFLEKVRSSFPQVLRVVKTRQVTYVNLNHLIDYVHNLEKIGILEEKEMAHLHDAVQTGL			
S1SOS1	(632)	GESEIASLVIKESEEGEELARKFLEKVRSSFPQVLRVVKTRQVTYAVLNHLIDYVHNLEKIGILEEKEMAHLHDAVQTDL			
AtSOS1	(718)	KKLLRNPPVVKLPKLSDMITSHPLSVALPPAFCEELKHSKKEPKLRGVTLTYKEGSKETVWVLLFDGLVKKSKILSNNH			
S1SOS1	(712)	KRLVRNPPVVKLPKLFDLISVNPPLGALPPTVREELIGSTKEIMKLRGATLYEKGSKATVWVLLSNGVVKWSSKSTSNIH			
AtSOS1	(798)	SLHPTFSHGSTLGLYEVLGKPYLCDLITDSVLCFFLDSEKILS-LSDSTLIDDFLWQESALVLLKLLPQIFFSVAMQ			
S1SOS1	(792)	LLHPTFSHGSTLGLYEVLGKPYLCDLITDSVALCFSDNEAILLALSDPAVEDDFWQESALVLLKLLPQMFETLKMQ			
AtSOS1	(877)	ELRALVSTESSKLTIVYTGSEHEIDCNSTGLLLEGFVKPVGKIEELISSPAPLSPSNGNQSFHNSSEASGLMRVVSFSQA			
S1SOS1	(872)	DMRDLVAER-SIMSTYIRGESPELPHHSIGLLEGFVKSHGSHEELLSAPAELELEALEQQSFHNTEASGVHAASFHQP			
AtSOS1	(957)	TQYIVETRARAILFNIQAFSADRILHRRESLTPPSSSSDQLQRFKKEHFGMLSWPENIYAKQQQ-----EINKTTLS			
S1SOS1	(951)	SQYQVETRARVINFTIAGFLSGRELRRSS---SLLSHSIDHPSRSFSRELGGMLSWPENIYKAMQHRQDVERTGQQQETN			
AtSOS1	(1032)	LSRAMQLSIFGSMVNVYR-RSVSFGTYNNKLDNLIYKKIPLNPAQGLVSAKSE--SSTVTKKQLETRKHACQLFLKG			
S1SOS1	(1028)	MSRAMQLAIFGSMISDTRSRSEFEGISAARKTSHSQSYPEVRS DGVCVTLVSVRSEGSTTLIRKKAQVQGENKDMSTGLPS			
		**			
AtSOS1	(1109)	ESSTRQNTMVESSEDEDEDEGIIVRIDS-----PSKIVFRNDL-			
S1SOS1	(1108)	APIEESDTREYSSDDEGGDEHLIRIDSGRPSFPQWIAEEDKTS			

B



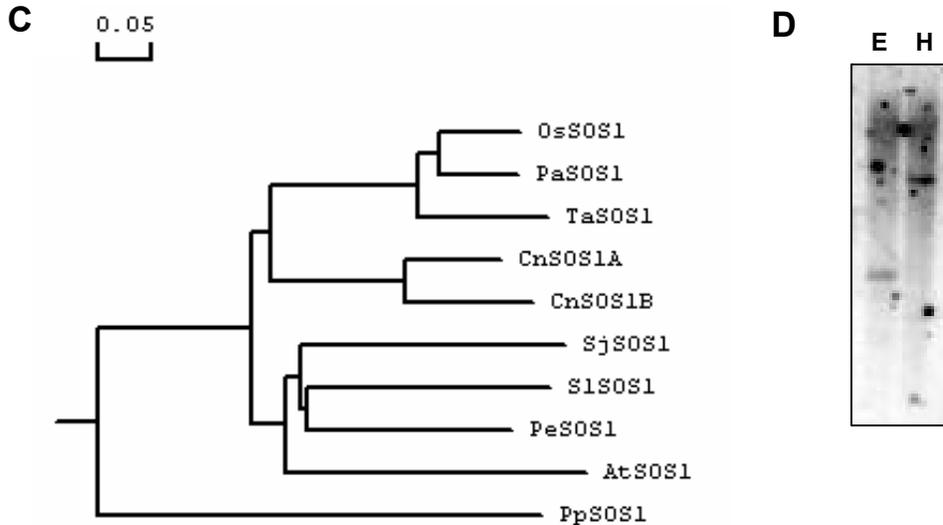


Figura R3. **A.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de *SIsSOS1* (acc. CAG30524.1) con *SOS1* de *Arabidopsis thaliana* (*AtSOS1*, Acc. NP_178307.2), realizado con el programa *ClustalW* (Thomson et al 1994). Los residuos idénticos y similares se resaltan en negro y gris, respectivamente. Las barras indican dominios transmembrana predichos por el programa *TMHMM* (<http://www.cbs.dtu.yadk>) (Krogh et al 2001). También se predice un dominio de intercambio Na^+/H^+ que abarca el dominio transmembrana completo desde los aminoácidos 27 al 443 (IPR006153, UniProtKB/TrEMBL, <http://beta.uniprot.org>), y un dominio de ligamiento a nucleótidos cíclicos situado centralmente en el largo dominio C-terminal, desde los aminoácidos 753 al 843 (IPR000595). Las flechas indican las secuencias de aminoácidos sobre las cuales se diseñaron los cebadores degenerados *DAB2p* y *RDAB6*. Se ha subrayado la secuencia aminoacídica correspondiente al ADNc usado para el silenciamiento génico de *SIsSOS1* (*RNAi*). Asteriscos en ¹¹²¹Ser y ¹¹²²Ser indican los sitios de fosforilación asignados inequívocamente en *AtSOS1*, catalizados por el complejo *AtSOS2/AtSOS3*. **B.** Representación esquemática de cada uno de los dominios mencionados en panel A (tomado de Oh et al 2007). **C.** Árbol filogenético no enraizado basado en las distancias evolutivas de las secuencias aminoacídicas codificadas por genes *SOS1* de diferentes especies vegetales, construido por el programa *ClustalW*. La barra de escala corresponde a 0.05 sustituciones de aminoácidos por sitio. Las secuencias de proteínas y sus respectivos números de acceso se han obtenido de la base de datos de genes del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). *CnSOS1A* y *CnSOS1B*, *Cymodocea nodosa* (CAD20320.1 y CAL44986.1, respectivamente); *OsSOS1*, *Oryza sativa* (AAW33875.1); *PaSOS1*, *Phragmites australis* (BAF41925.1); *PeSOS1*, *Populus euphratica* (ABF60872.1); *PpSOS1*, *Physcomitrella patens* (CAD91921.1); *SjsSOS1*, *Suaeda japonica* (BAE95196.1); *TaSOS1*, *Triticum aestivum* (AAQ91618.1). **D.** Southern blot de ADN genómico digerido con enzimas de restricción *EcoRI* (E) y *Hind III* (H), e hibridado con una sonda radioactiva P^{32} correspondiente a un fragmento de 300pb de la región C-terminal de *SIsSOS1*.

R.1.2. *SISOS2*

R.1.2.1. Aislamiento y clonaje

Mediante una consulta a las bases de datos de genes, se identificaron los clones EST257593 y EST 339816 de una genoteca de ESTs de hojas de *S. lycopersicum* cv R-11-12 resistente a *Pseudomonas*, que presentaba una alta homología a *AtSOS2*. Dichos clones fueron suministrados por el BTI, Universidad de Cornell, NY, USA. La secuenciación de ambos clones mostró que solo el clon EST257593, que portaba un inserto de 1766 pb (**Fig. R4, carril 1**), contenía el ORF completo de 1341 pb del gen putativo de *SISOS2*, ya que codificaba a una secuencia aminoacídica que presentaba efectivamente la mayor homología con la isoforma *AtCIPK24* o *AtSOS2*, de entre todas las isoformas (25) de CIPKs existentes en esta especie (**Fig. R6C**).

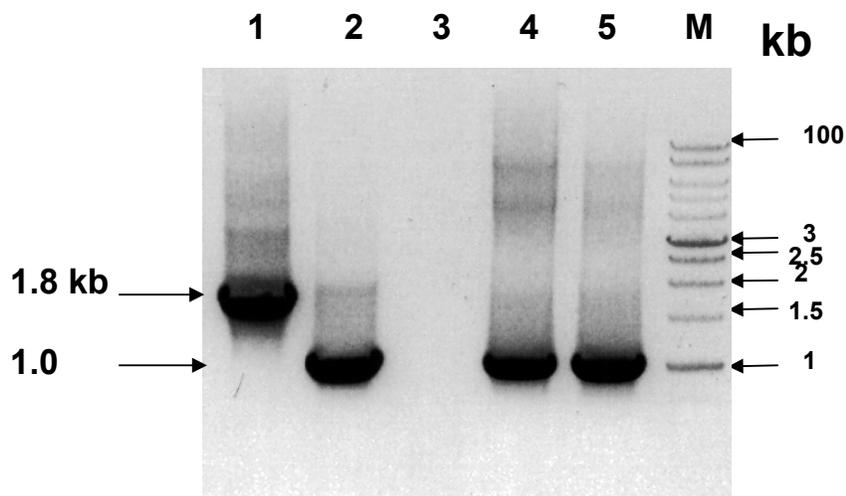


Figura R4. Aislamiento por PCR con cebadores del vector *pBluescript* de los insertos de los clones EST 257593, carril 1; EST 339816, carril 2; EST441626, carril 4 y 5; blanco sin molde, carril 3, M, marcador. Las condiciones de PCR fueron 94°C/3min, 35x[94°C/30s, 55°C/45s, 72°C/2.5 min], 72°C/7min, y 4°C.

El ORF de *SISOS2* se amplificó por PCR con la *Pfu DNA polymerase* (**Fig. R5A**), utilizando como molde, una reacción de RT, a partir de ARN total de tallos de *S. lycopersicum* cv. Pera y los cebadores S2Feco y S2Reco (**Tabla M4**), que contenían cada uno, un sitio *EcoRI*, para ser clonado directamente, en el sitio *EcoRI* del vector de expresión de levaduras p414-GPD, bajo control del promotor *GPD* (**Tabla M3**) (**Fig.**

R5B), previa digestión del fragmento y del plásmido. Finalmente, se comprobó por secuenciación que el inserto se había subclonado en dirección correcta.

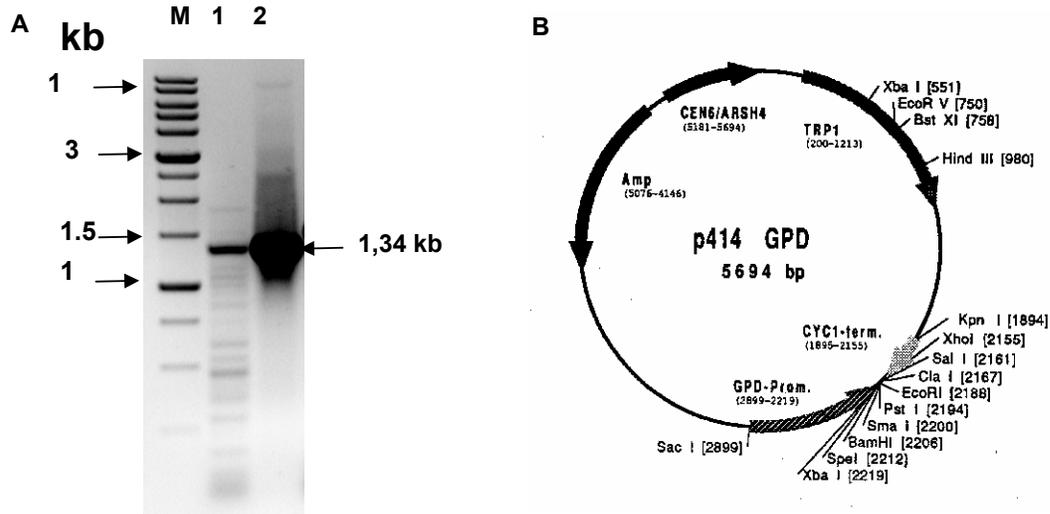


Figura R5. A. Aislamiento del ORF de *SISOS2* con cebadores *S2Feco* y *S2Reco*, carriles 1 y 2. Las condiciones de PCR fueron $94^{\circ}\text{C}/3\text{min}$, $35 \times [94^{\circ}\text{C}/30\text{s}$, $55^{\circ}\text{C}/45\text{s}$, $72^{\circ}\text{C}/1.5\text{ min}]$, $72^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ y 4°C . B. Estructura del plásmido *p414GPD* para la expresión de *SISOS2* en levaduras.

A

	1	60
S1SOS2	(1)	MRKVKRKL GKYEVGRTIGEGTFAKVKFARNTETGDNVAIKVLA KSTILKERMV E QIKREI
AtSOS2	(1)	MRKVMRRV GKYEVGRTIGEGTFAKVKFARNTDTGDNVAIKIMAKSTILKNRMVDQIKREI
	61	120
S1SOS2	(61)	SIMKIVRHPCIVRLHEVFLASQTKIYIVQEFVTGGELFDKIVHKGRLSEDEARRYFQQLID
AtSOS2	(61)	SIMKIVRHFNIVRLHEVFLASPSKIYIVLEFVTGGELFDRIVHKGRLSESESRKYFQQLVD
	121	180
S1SOS2	(121)	AAAHCHSKGVYHRDLKPENLLLDFOGNLKTSDFGLSALPQQVELLYTTCGTPPNYVAPEV
AtSOS2	(121)	AAAHCHCKGVYHRDLKPENLLLDFTGNLKVSDFGLSALPQEGVELLRITTCGTPPNYVAPEV
	181	240
S1SOS2	(181)	LGNRGYDGAADVWSCGIIILYVLMAGYLPFSETDLPILYTKI NAAEFSCPWFSPGATSL
AtSOS2	(181)	LSGQGYDGSAAIWSGCVILFVILAGYLPFSETDLPGLYRKINAAEFSCPWFSAEVKFL
	241	300
S1SOS2	(241)	IQRHIDPNPQTRIKIDGIKRDPWFRKNYRAVKAKADEVNLDDIHAVFDDEDAFVSEKKS
AtSOS2	(241)	IHRILDPNPKTRIQIGIKKDPWFRNLNYVPIRAREEEVNLDDIHAVFDGIEGSYVAENV
	301	360
S1SOS2	(301)	EDSESGPLVMNAFEMITLSQGLNLSALFDRRDYVKRQTRFISRQPAKVVIETIEAAAES
AtSOS2	(301)	ERNDEGPLMMNAFEMITLSQGLNLSALFDRRQDFVKRQTRFVSRREPSEITANIEAVANS
	361	420
S1SOS2	(361)	IGLKVHTRDYKTRIEGVTANRAGQFAVVLEVFQVAPSLFMVDVRKAAGDTLEYHKFYKTF
AtSOS2	(361)	MGEKSHTRNEKTRLEGLSSIKAGQLAVVLEIYEVAPSLFMVDVRKAAGDTLEYHKFYKKL
	421	446
S1SOS2	(421)	CTKIDDV IWKPKEGMSNAVLLRTRTR
AtSOS2	(421)	CSKLENI IWRATEGIPKSEILRITTF

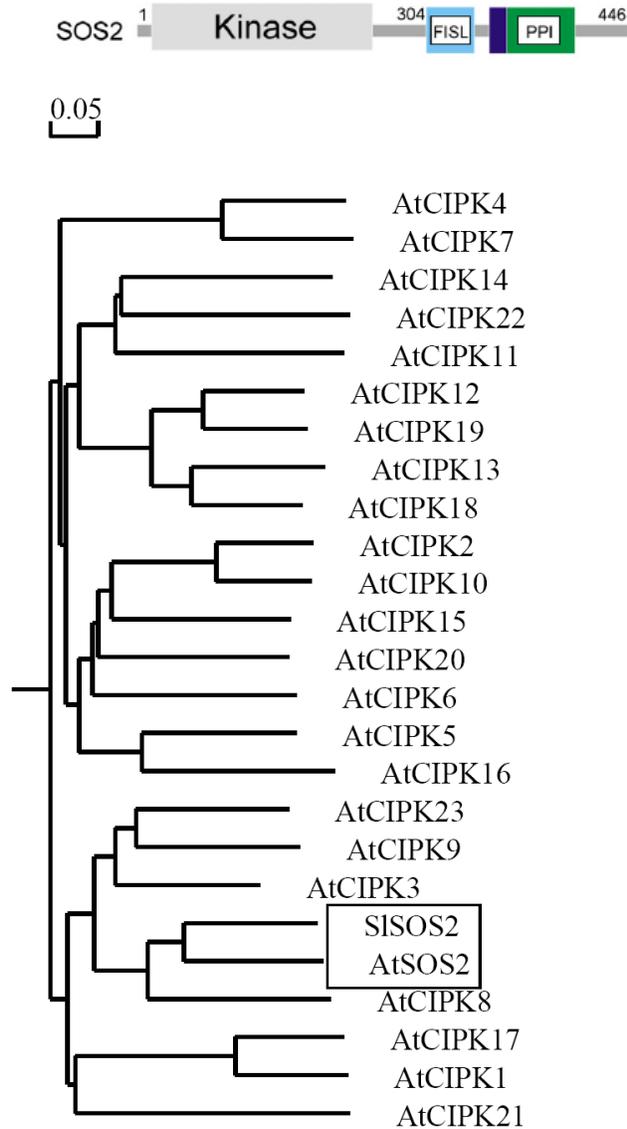


Figura R6. A. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de SISOS2 (acc. CAG30526.1) con SOS2 de *Arabidopsis thaliana* (AtCIPK24, Acc. AAK72257) usando el programa Clustal W (Thomson et al 1994). Los residuos idénticos y similares se resaltan en negro y gris, respectivamente. Se indican el segmento correspondiente al bucle catalítico (a) con el aspártico como sitio catalítico (*); el bucle de activación (b); los dominios FISL o NAF (d) y PPI (e) (Marchler-Bauer et al 2007). La sustitución de la treonina en el bucle de activación por aspártico (c) y la flecha que indica el truncado del extremo C-terminal en la leucina en posición 308 en AtSOS2, resultan en una proteína quinasa independiente de SOS3 (Guo et al 2001, 2004). B. Representación esquemática de cada uno de los dominios mencionados típica de la subfamilia de CIPKs (tomado de Sánchez-Barrena et al 2007). C. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de la secuencia aminoacídicas de SISOS2 y las de la familia de proteínas AtCIPKs. La barra de escala indica 0.05 sustituciones por sitio. Las secuencias proteicas se obtuvieron de la base de datos del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los números de acceso para cada CIPK se obtuvieron del anterior enlace o de Kolukisaoglu et al (2004).

La secuencia de *SISOS2* se depositó en la base de datos de genes del GenBank/EMBL con el número de accesoión AJ717348.

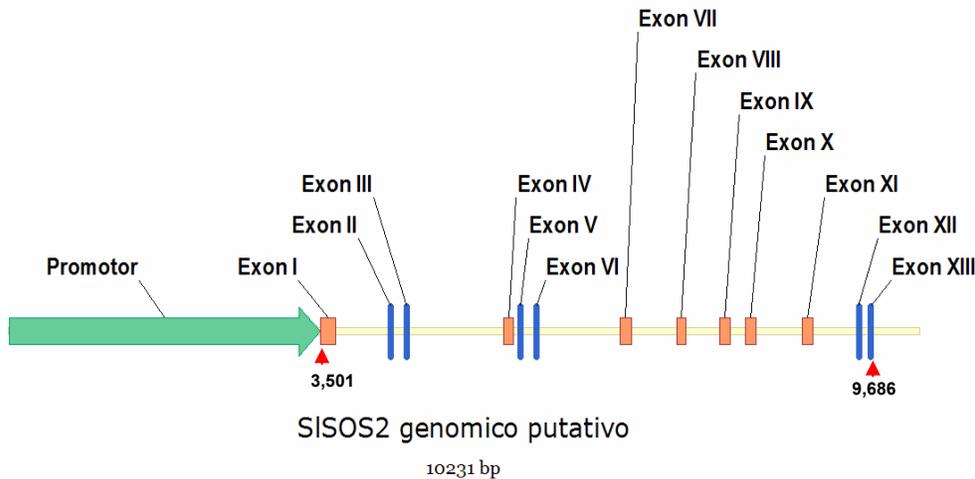


Figura R7. Estructura de la secuencia genómica de *SISOS2* con la disposición de los exones (cajas) e intrones (líneas entre cajas). Las posiciones son relativas al codón de iniciación.

R.1.2.2. Análisis de la secuencia de *SISOS2*

El marco abierto de lectura (ORF) de *SISOS2* está formado por 1341 pb que codifica una proteína de 446 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 51 kDa (**Fig R6A**). Esta proteína putativa de *SISOS2*, alineada con las 25 isoformas que componen la subfamilia de serina-proteína quinasas en *Arabidopsis*, las denominadas SnRK3 (Hrabak et al 2003), CIPK (*Calcineurin-Interacting protein kinase*) (Kolukisaoglu et al. 2004) o PKS (*Protein kinase SOS2-like*) (Gong et al 2004), según la variable nomenclatura existente (**Fig. A10**), presentaba la mayor homología, un 71% de identidad, con AtSOS2, también conocida como AtCIPK24 o PKS SOS2, o SnRK3.11, mientras que fueron del 64% con AtCIPK8, 60% con AtCIPK3 y 53% con AtCIPK23 y AtCIPK9, y mas baja del 50 %, con el resto de las proteínas AtCIPKs (**Fig R6C**).

La secuencia aminoacídica codificada por este gen de tomate tiene la estructura secundaria típica de esta subfamilia de quinasas (**Fig R6A y B**): un dominio N-terminal quinasa relacionado con las SNF1 de levadura y AMPDK de animales (IPR0170909, UniProtKB/TrEMBL, <http://beta.uniprot.org>) y un dominio C-terminal regulador

autoinhibitorio, en la que destaca la presencia del dominio FISL o NAF (IPR004041) de 21 aminoácidos por donde interacciona con SOS3.

En una búsqueda reciente de genes homólogos en las bases de datos génicas para *SISOS2*, se identificó la secuencia genómica completa de *SISOS2*, incluida su región promotora (**Fig. R7**). Dicha secuencia estaba contenida en la secuencia completa del cromosoma 12 de tomate (*S. lycopersicum* cv. Heinz 1706) (acc. nº 209588). El alineamiento de *SISOS2* del ADNc con dicha secuencia permitió la identificación del promotor de 3500 pb y de las posiciones relativas de los 13 exones y 13 intrones de los que contiene. El análisis de la secuencia promotora de este clon genómico, utilizando una región de 1500 pb, de los aproximadamente 3000pb que contiene 5' aguas arriba inmediatamente por encima del codón de inicio, se llevó a cabo *in silico* mediante la comparación de dicha secuencia con las de la base de datos PLACE (Plant *Cis*-acting Regulatory DNA Elements, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>) (Higo *et al.*, 1999). Dicha secuencia mostró un enorme número de elementos reguladores en *cis* (*cis-regulatory elements*) que se recopilan en la **Tabla Ap1 (Apéndice)**. Aunque sería enormemente prolijo enumerar aquí cada uno de estos elementos, podemos destacar que el promotor de *SISOS2* posee elementos reguladores en *cis* implicados en la regulación de la expresión específica de tejido (p.e., endospermo, embrión), luz, hormonas (giberelinas, ABA, etileno y auxinas) y estreses bióticos y abióticos.

R.1.3. *SISOS3*

R.1.3.1. Aislamiento y clonaje

Mediante una consulta a las bases de datos de genes, se identificó el clon EST441626 de una genoteca de ESTs de raíces de tomate, *S. lycopersicum* cv. TA496, en el estadio de preántesis, que presentaba una alta homología a *AtSOS3*. Dicho clon fue suministrado por el BTI, Universidad de Cornell, NY, USA. La secuenciación del inserto que portaba el clon EST (**Fig. R4, carril 4 y 5**) reveló la presencia de un marco abierto de lectura (ORF) incompleto de 1 kb, faltando aproximadamente unos 63 pb hasta el codón de inicio. La secuencia completa del ortólogo putativo de tomate se obtuvo mediante RACE-5', usando el *kit SmartTM 5'-3' RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech, BD Biosciences) (**apartado M.4.4.**), utilizando el ARN total de raíces de tomate *S.*

lycopersicum cv. Moneymaker y el cebador reverso Rac5-S3R. En la PCR subsiguiente, utilizando la reacción de RACE 5'-RT como molde y cebadores UPM (directo) y reverso Rac5-S3R, se obtuvo un fragmento de ADNc de aprox. 880 pb que abarcaba el extremo 5' (**Fig. R8A**). La secuenciación de este fragmento con cebador Rac5-S3R y un nuevo cebador reverso 5S3-R1 que anidaba aguas arriba del mismo, reveló la secuencia del ORF completo.

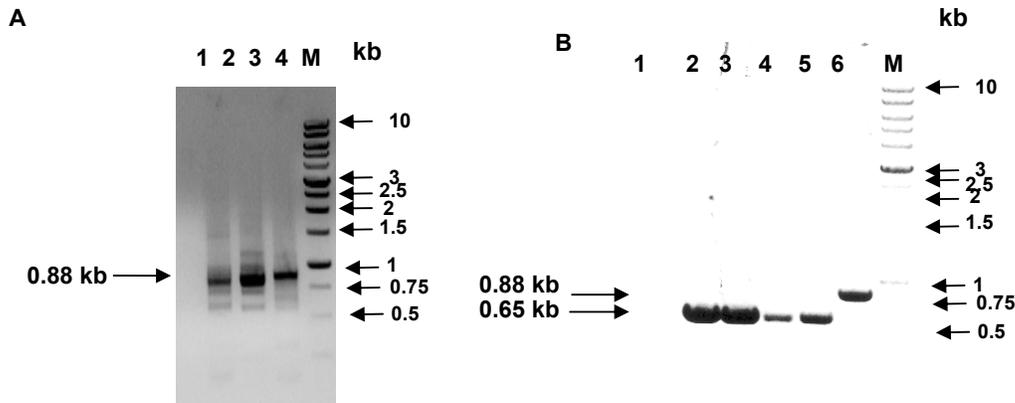


Figura R8.A. Reacciones de RACE-5' para el aislamiento del ORF de *SISOS3*. *M*, marcador; 1, blanco sin molde; 2,3,4, reacciones de RACE-5'. La reacción de RT se llevó a cabo como en apartado M.4.4. Las condiciones de PCR fueron como en Tabla M5. **B.** Aislamiento del ORF de *SISOS3* utilizando como molde la reacción de RACE5'-RT con cebadores S3FXho y S3RNot. Las condiciones de PCR fueron 94°C/3min, 35x[94°C/30s, 57°C/45s, 72°C/1 min], 72°C/5min, y 4°C. *M*, marcador, 1, blanco sin molde 2,3,4,5, reacciones con molde RACE5'-RT; 6. reacción de RACE-5' como en panel A.

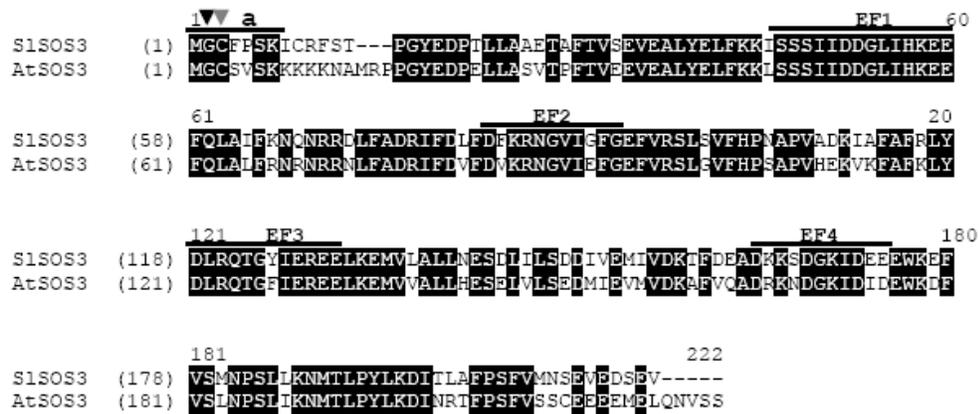
El ORF de *SISOS3* que contenía 645 pb, se amplificó por PCR con la *Pfu DNA polymerase* (**Fig. R8B**) utilizando como molde una alícuota de la reacción de RACE 5'-RT y los cebadores S3FXho y S3RNot, que contenían un sitio *XhoI* y *NotI*, respectivamente, para ser clonado directamente, de forma unidireccional en los sitios *XhoI* y *NotI*, del vector de expresión de levaduras pDR195.

La secuencia de *SISOS3* se depositó en la base de datos de genes del GenBank/EMBL con el número de acceso AJ717347.

R.1.3.2. Análisis de la secuencia de *SISOS3*

La secuencia nucleotídica de *SISOS3* codifica una proteína putativa de 214 aminoácidos

A



B

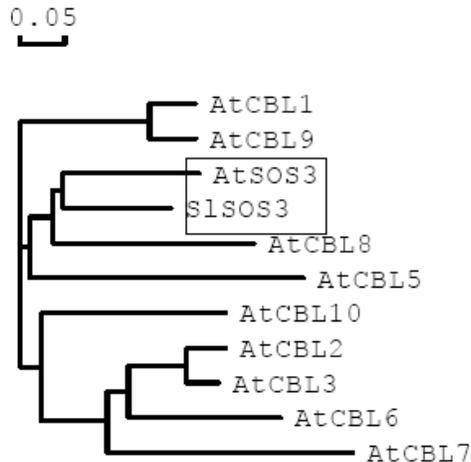


Figure R9. A. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de S1SOS3 (acc. CAG30525.1) con SOS3 de *Arabidopsis thaliana* (AtCBL4, acc. AAG28402.1) usando el programa Clustal W (Thomson et al 1994). Los residuos idénticos y similares se resaltan en negro y gris, respectivamente. Se indican los segmentos correspondientes a los dominios putativos EF-hands (Marchler-Bauer et al 2007), así como los motivos conservados N-terminal (a) para N-miristoilación en el residuo de glicina (cabeza de flecha negra) y S-palmitoilación en el de cisteína (cabeza de flecha gris) como predice el programa Terminator (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/index.html>, Meinnel et al 2005). B. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de la secuencia de aminoacídica de S1SOS3 y las de la familia de proteínas AtCBLs. La barra de escala indica 0.05 sustituciones por sitio. Las secuencias proteicas se obtuvieron de la base de datos del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los números de accesoión para cada CIPK se obtuvieron del anterior enlace o de Kolukisaoglu et al (2004).

con un peso molecular calculado de 24570 daltons. Esta secuencia alineada con las 10 isoformas existentes en *Arabidopsis*, pertenecientes a esta familia de proteínas sensoras de Ca^{2+} , también conocidas por CBLs (*CalcineurinB-like*) o SCaBP (*SOS3-like Calcium Sensor Binding Protein*) (Gong et al 2004; Kolukisaoglu et al. 2004), daba un 77 % de identidad con AtSOS3 (**Fig. R9A**), también conocida como CBL4, 73% con las CBL1 y CBL9 y 71% con CBL8, con identidades menores de 70 con el resto de CBLs (**Fig. R9B**). La proteína codificada por este gen contiene dos pares de motivos *EF-hands* (IPR015757, UniProtKB/TrEMBL, <http://beta.uniprot.org>) con 4 sitios putativos de ligamiento del Ca^{2+} . Asimismo, como AtSOS3, presenta un motivo de miristoilación en la glicina 2 y S-palmitoilación en la cisteína 3 del extremo N-terminal, como predice el programa Terminator (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/index.html>, Meinel et al 2005), a través de los cuales se ancla a la membrana plasmática para reclutar a SOS2 (Quintero et al 2002). La secuencia de SISOS3 ha sido depositada en el EMBL con el n° de acceso AJ717347.

R.2 Caracterización funcional de *SISOS* en levadura

Para comprobar que las proteínas codificadas por estos genes de tomate constituyen los verdaderos ortólogos de *AtSOS* y funcionan en la misma ruta de respuesta, se han llevado a cabo experimentos de reconstitución funcional del sistema SISOS en levaduras de la cepa mutante AXT3K ($\Delta nhx1$, $\Delta ena1-4$, $\Delta nha1$), hipersensible a condiciones salinas, por ser defectiva en todos los transportadores de Na^+ conocidos (Quintero et al. 2000). Por tanto, el rescate de su fenotipo tolerante a la sal por complementación funcional con estos genes constituiría una evidencia circunstancial de su papel en la extrusión de Na^+ (Quintero et al. 2002). Para ello, se han clonado *SISOS1*, 2 y 3 en los plásmidos de expresión de levadura pYPGE15, p414GPD y pDR195, respectivamente (**apartado M.6.1**). En primer lugar, se comprobó la funcionalidad de SISOS1 en el mutante de levadura. A pesar de que en trabajos anteriores, se había demostrado la necesidad de coexpresar SOS1 con el complejo quinasa SOS2/SOS3, que llevaría a cabo la fosforilación del primero, activándolo (Qiu et al 2002, Shi et al. 2002, Quintero et al. 2002), la expresión de éste por sí mismo ya era capaz de conferir algo de tolerancia al mutante de levadura, siendo capaz de crecer en un medio suplementado con 100 mM de NaCl (**Fig. R10**).

Para comprobar que efectivamente SISOS1 era más activo en presencia de sus proteínas reguladoras se llevó a cabo la complementación de la cepa mutante reconstituyendo SISOS1 con la versión de AtSOS2 hiperactiva e independiente de SOS3 (SOS2T/DA308) (Guo et al. 2001). La coexpresión de SISOS1 con el mutante hiperactivo de SOS2 de *Arabidopsis* y con el complejo SOS2/SOS3 de *Arabidopsis* promovió una mayor tolerancia a la sal, siendo en este caso capaz de crecer hasta en 300 mM NaCl (Fig. R10).

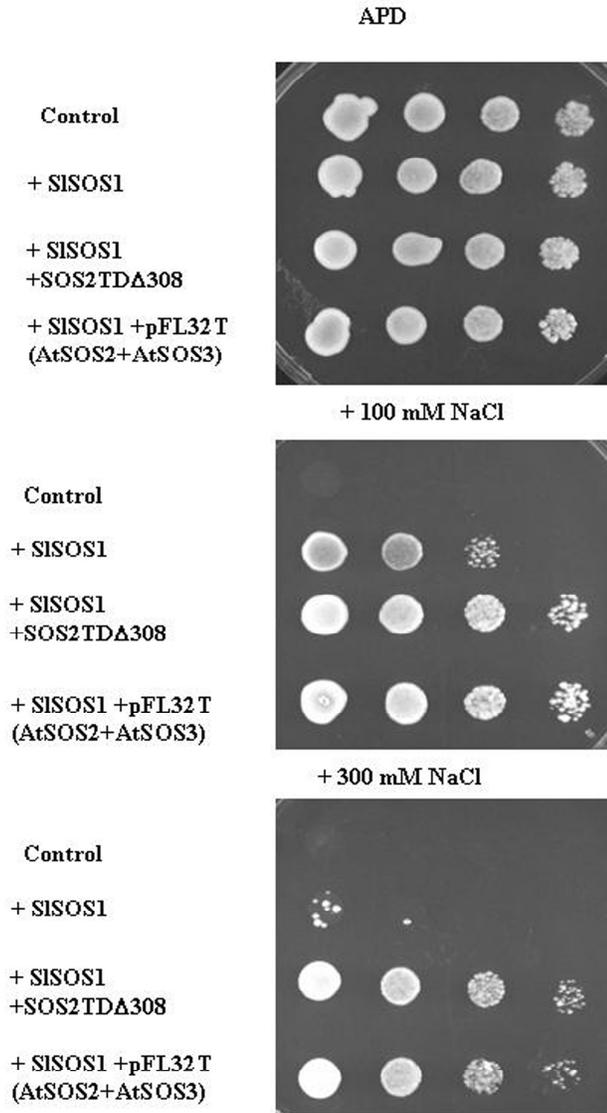


Figura R10. Análisis funcional de SISOS1 en levadura. Cinco microlitros de diluciones seriadas (1/10) se aplicaron en placas de medio AP con 1 mM KCl (APD) suplementadas con las concentraciones indicadas de NaCl. La cepa AXT3K portando el plásmido vacío pYPGE15 se empleó como Control.

Para demostrar que la proteína codificada por el gen *SISOS2* y *SISOS3* eran los ortólogos respectivos de *AtSOS2* y *AtSOS3*, y por tanto, formaban parte del complejo regulador de la actividad de *SOS1*, ambos genes de tomate se expresaron en la cepa de levadura AXT3K con *AtSOS1* insertado en su genoma (Guo et al 2004). La expresión de *SISOS2* junto con *AtSOS1* no incrementó sensiblemente la tolerancia de la cepa mutante, siendo precisa la coexpresión de *SISOS2* junto a *SISOS3* para formar el complejo quinasa y así incrementar la halotolerancia de las células de levaduras, permitiendo que éstas crecieran en un medio suplementado con 100 mM de NaCl (**Fig. R11**).

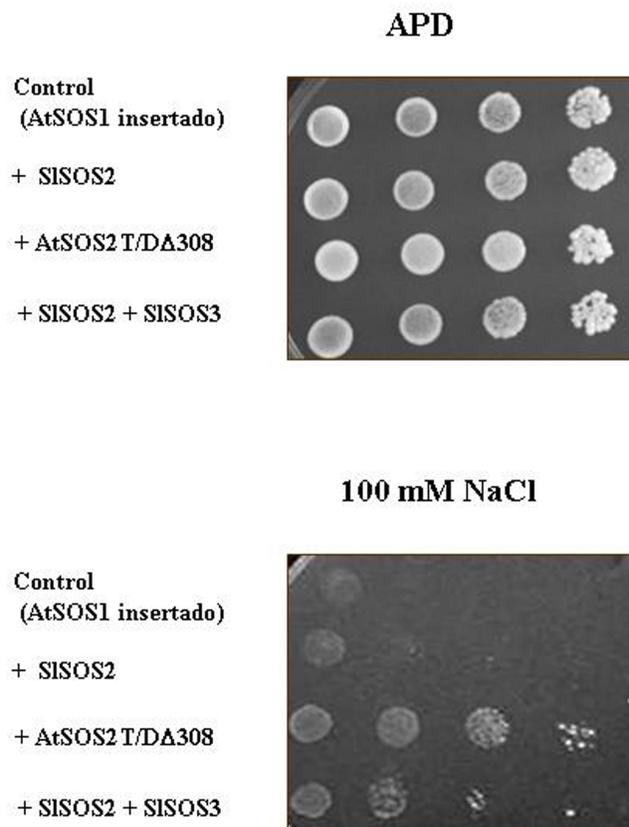


Figura R11. Análisis funcional de *SISOS2* en levadura. Cinco microlitros de diluciones seriadas (1/10) se aplicaron en placas de medio AP con 1 mM KCl (APD) suplementadas con las concentraciones indicadas de NaCl. La cepa AXT3K con *AtSOS1* insertado en su genoma se empleó como Control.

Finalmente, la inserción de una copia de *SISOS1* en el genoma de la cepa de levadura AXT3K (**apartado M.5.1**, Guo et al. 2004), ha permitido la reconstitución del sistema SISOS completo (**Fig. R12**), de forma análoga al de *Arabidopsis* (Quintero et al. 2002) y al de arroz (Martínez-Atienza et al. 2007). Como ocurrió con el de *Arabidopsis* (Guo et al 2004), la cepa AXT3K con *SISOS1* insertado soportó concentraciones de NaCl más bajas que la misma cepa cuando expresa SISOS1 mediada por un vector plasmídico. No obstante, la coexpresión de SISOS2 y SISOS3 incrementó la tolerancia de la primera, demostrando que el complejo SOS2/SOS3 de tomate fue capaz de activar SISOS1 en levadura (**Fig. R12**). Todos estos resultados fueron indicativos de que los genes que componen el sistema *SISOS* de tomate son los verdaderos ortólogos de *AtSOS* y funcionan en la misma ruta de respuesta.

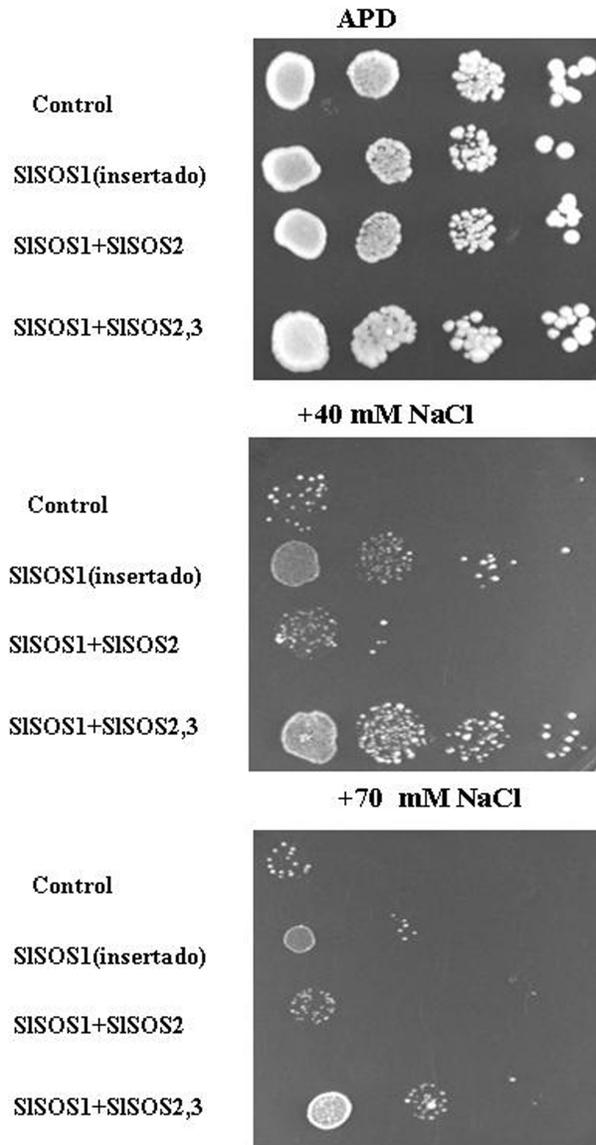


Figura R12. Análisis funcional del sistema SISOS en levadura. Cinco microlitros de diluciones seriadas (1/10) se aplicaron en placas de medio AP con 1 mM KCl (APD) suplementadas con las concentraciones indicadas de NaCl. La cepa AXT3K con el plásmido vacío se empleó como Control.

R.3. Complementación funcional de mutantes *sos* de *Arabidopsis* con los genes *SISOS*

Los genes de *AtSOS1*, *AtSOS2* y *AtSOS3*, y también, los respectivos genes de arroz, complementaron funcionalmente las líneas respectivas mutantes *sos* (*salt-overly sensitive*) de *Arabidopsis* (Liu y Zhu 1998, Shi et al. 2000, Liu, et al. 2000, Martínez-Atienza et al. 2007). De forma similar, se diseñaron experimentos para comprobar de forma adicional que los genes *SISOS1*, *SISOS2* y *SISOS3* eran los verdaderos ortólogos de *AtSOS*, mediante la capacidad de cada uno de ellos de complementar funcionalmente los respectivos fenotipos hipersensibles a la sal de estos mutantes *sos* de *Arabidopsis*. Sin embargo, todos los intentos de ensayo de *SISOS1* en *Arabidopsis* fueron infructuosos, ya que tras numerosos intentos de clonaje en pCAMBIA, encontramos invariablemente la secuencia de *SISOS1* mutada, con deleciones, cambio marco de lectura etc, tanto después de aislar el plásmido de *E. coli* como de *Agrobacterium*. Una explicación plausible para este hecho es la dada por Martínez-Atienza et al. (2007), que encontraron una expresión residual debido al promotor viral 35S del transportador de *SOS1*, que parece ser deletéreo para *Agrobacterium* y quizás para *E. coli*, en presencia de Na^+ . Sin embargo, la sustitución del Na^+ por el K^+ en medio LB, no resolvió tampoco el problema, por lo que este ensayo fue abandonado. No obstante, el hecho de que haya una sola isoforma de *SISOS1* en el genoma de tomate (**Fig. R3C**), y que haya podido llevarse a cabo la caracterización funcional *in planta* por RNAi, minimiza la importancia de este ensayo en la demostración de la homología funcional de *SISOS1* con el de *Arabidopsis*.

R.3.1. Complementación funcional de mutantes de *Arabidopsis sos2-2* con *SISOS2*

Tras comprobar que efectivamente *SISOS2* era capaz de activar tanto *SISOS1* como *AtSOS1* en mutantes de levadura y así conferirles una mayor tolerancia a la salinidad, se procedió a comprobar si el gen de tomate era capaz de complementar la función de *AtSOS2* cuando aquel era sobreexpresado en mutantes *sos2-2* de *Arabidopsis* nulos para el gen endógeno. Los mutantes *sos2-2* tienen una deleción de dos pares de bases que correspondiente a los nucleótidos 1521 y 1522, que coinciden con los dos primeros nucleótidos del codón de inicio de la traducción (Liu et al. 2000). Dichos mutantes

muestran un ligero defecto en su desarrollo en condiciones normales de cultivo, que es aun más exagerado cuando las plantas crecen en condiciones salinas. Se obtuvieron un total de 28 líneas transformadas independientes, de las cuales 8 fueron seleccionadas 3 generaciones más tarde como homocigóticas, y con una sola copia del gen, ya que cumplían las proporciones de segregación mendeliana (3:1), en la F2, determinada por la capacidad de germinación y desarrollo de la plántula en medio MS con higromicina, cuyo gen de resistencia está presente en el vector de expresión utilizado.

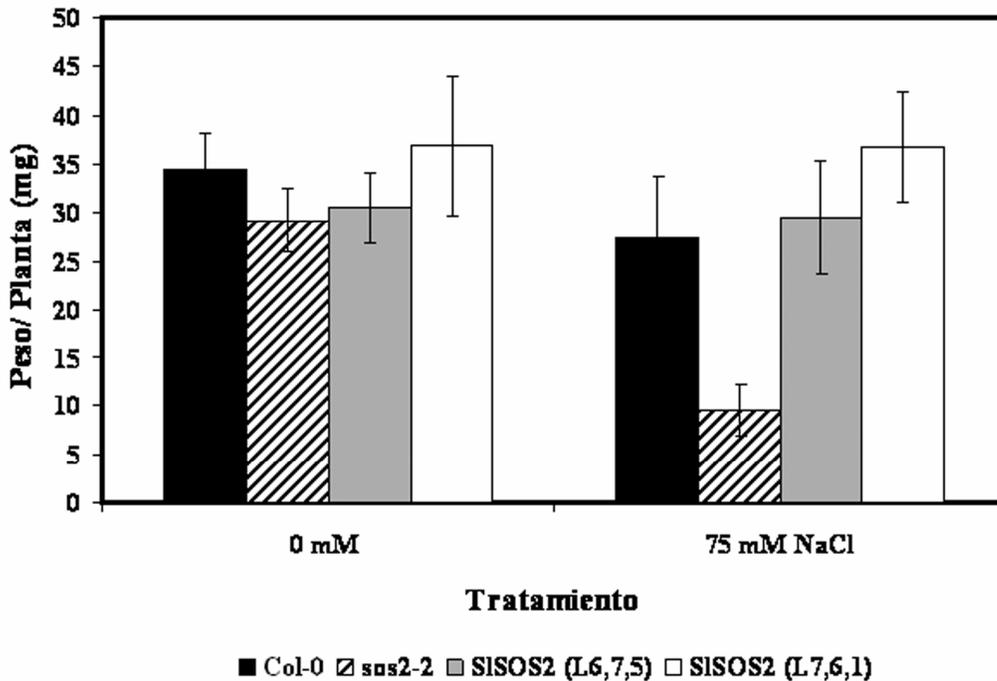


Figura R13. Complementación de los mutantes de *Arabidopsis sos2-2* con *SISOS2*. Plántulas crecidas en medio MS durante 4-6 días se transfirieron a medio suplementado con 75 mM NaCl durante 4 días de tratamiento. Cuantificación del crecimiento de las plántulas expresado como peso fresco por planta en mg. Los datos son media y desviación estándar de al menos 30 plántulas individuales por cada línea.

Se escogieron 2 líneas de la F3 al azar para los siguientes experimentos. En condiciones de ausencia de sal, el crecimiento, expresado tanto en términos de peso fresco como en longitud de raíz, de las plantas transgénicas que sobreexpresaban *SISOS2*, bajo control del promotor constitutivo 35S, desarrolladas durante 7 días (medio MS) fue aparentemente igual que las silvestres (**Figs. R13, R14**). Sin embargo, cuando las plantas crecieron en medio MS suplementado con 75 mM NaCl, los mutantes *sos2-2* prácticamente no se desarrollaban, mientras que las plantas transformadas con *SISOS2*

eran capaces de crecer casi hasta el mismo nivel que las silvestres (**Figs R13, R15**). Los resultados obtenidos demuestran que SISOS2 es el homólogo funcional de AtSOS2.

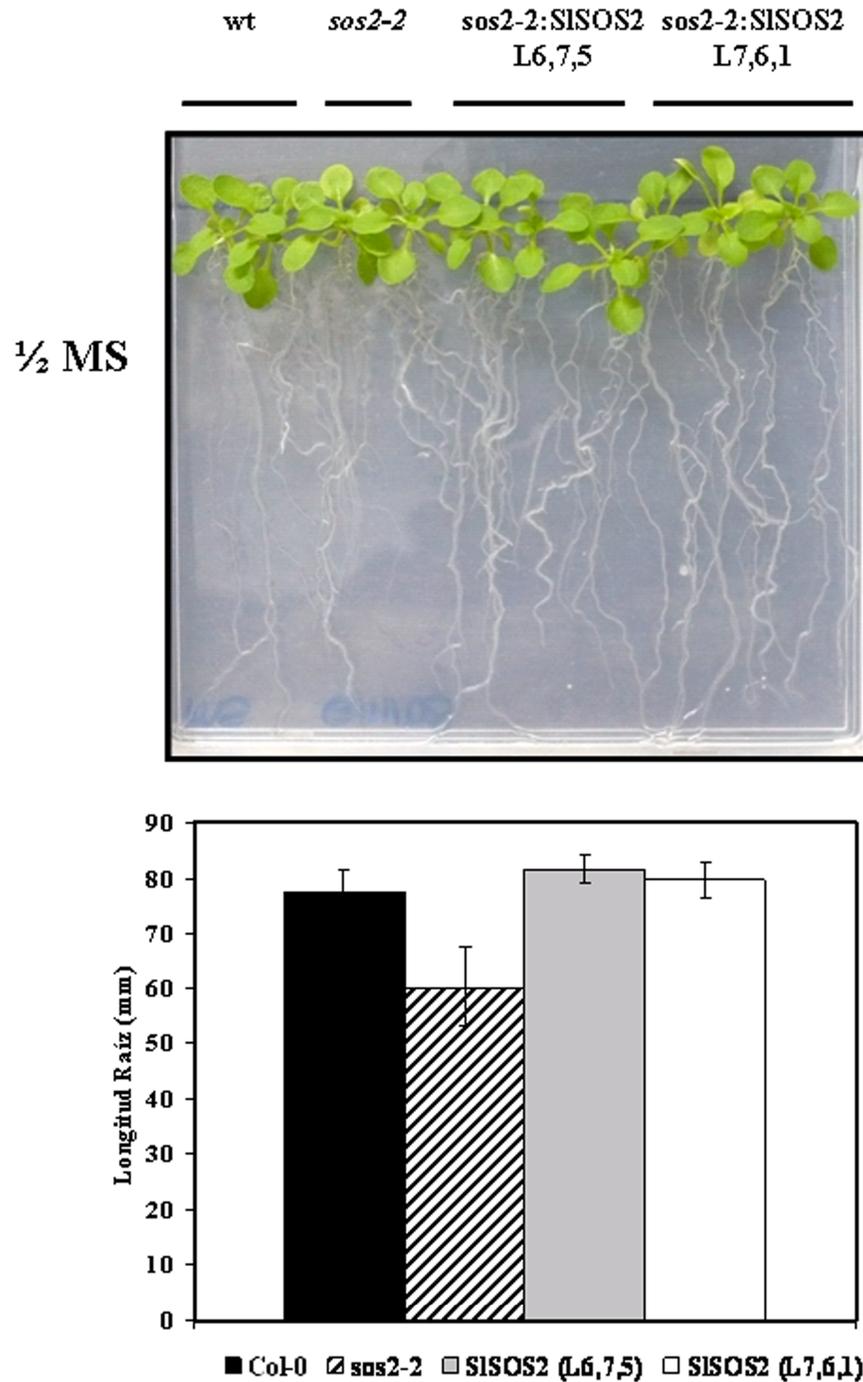


Figura R14. Complementación de los mutantes de *Arabidopsis sos2-2* con *SISOS2*. Plántulas crecidas en medio MS durante 7 días. La longitud de la raíz se midió el último día. Los datos son media de 30 plantas individuales por línea.

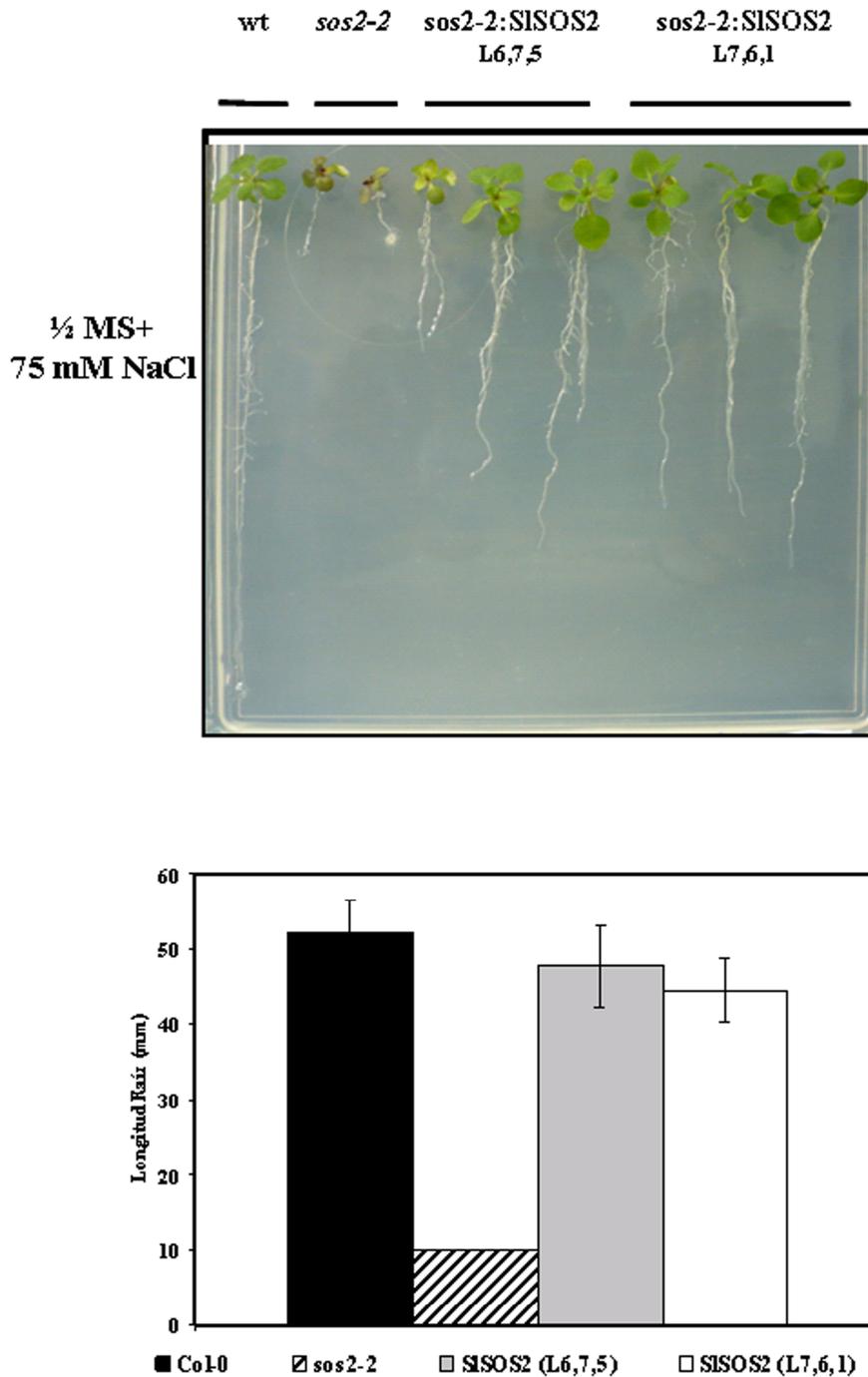


Figura R15. Complementación de los mutantes de *Arabidopsis sos2-2* con *SISOS2*. Plántulas crecidas en medio MS durante 4-6 días se transfirieron a medio suplementado con 75 mM NaCl y se midieron después de 7 días de tratamiento. Los datos son media y desviación estándar de al menos 30 plántulas individuales por cada línea.

R.3.2. Complementación funcional de mutantes de *Arabidopsis sos3* con *SISOS3*

Una vez demostrado que *SISOS3*, expresado de manera heteróloga en levadura, se comportaba como el homólogo funcional de *AtSOS3*, formando el complejo quinasa junto con *SISOS2*, necesario para activar *AtSOS1*, y en menor medida, *SISOS1* (**Figs. R11 y R12**), se procedió a confirmar que esto ocurría también *in planta*. Para ello, se realizaron ensayos funcionales de complementación génica del mutante *sos3-1* de *Arabidopsis*. Los mutantes *sos3-1* tienen una delección de 9 pares de bases en la posición +759 de la secuencia genómica de *SOS3* que anula la funcionalidad de *AtSOS3* (Liu y Zhu 1997 y 1998), impidiendo el crecimiento de las plantas en presencia de altas concentraciones de Na^+ (Ishitani et al. 2000).

Se obtuvieron un total de 9 líneas transformadas independientes, F1, de las cuales se obtuvieron 4 de la F2. Para llevar a cabo los experimentos de complementación se emplearon plantas transgénicas F2 germinadas en medio MS de una de las líneas escogida al azar. En condiciones de ausencia de sal, el crecimiento, expresado tanto en términos de peso fresco como en longitud de raíz, de las plantas transgénicas que sobreexpresaban *SISOS3*, bajo control del promotor constitutivo 35S, desarrolladas durante 11 días (medio MS), fue aparentemente igual que las silvestres (**Figs. R16, R18**). Sin embargo, cuando las plantas crecieron en medio MS suplementado con 75 mM NaCl, los mutantes *sos3-1* prácticamente no se desarrollaban mientras que las plantas transformadas con *SISOS3* eran capaces de crecer, aunque no hasta el mismo nivel que las silvestres (**Figs. R17, R18**). Los resultados obtenidos demuestran que *SISOS3* es capaz de sustituir *in planta* la proteína endógena de *Arabidopsis*, *AtSOS3*, confirmando así la homología funcional entre ambas proteínas.

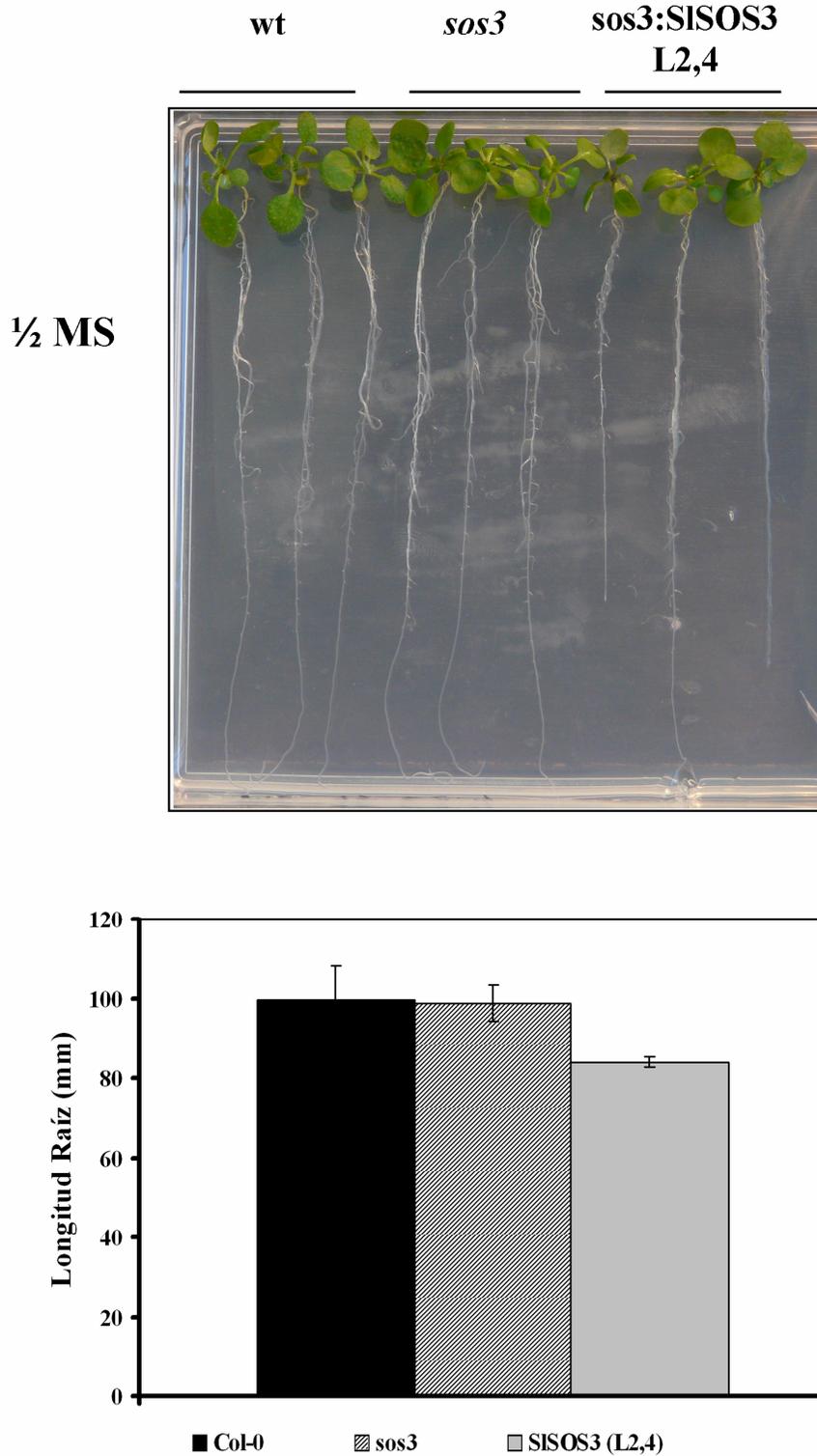


Figura R16. Complementación de los mutantes de *Arabidopsis sos3*. Plántulas crecidas en medio MS durante 11 días. La longitud de la raíz se midió el último día. Los datos son media de 70 plantas individuales por línea.

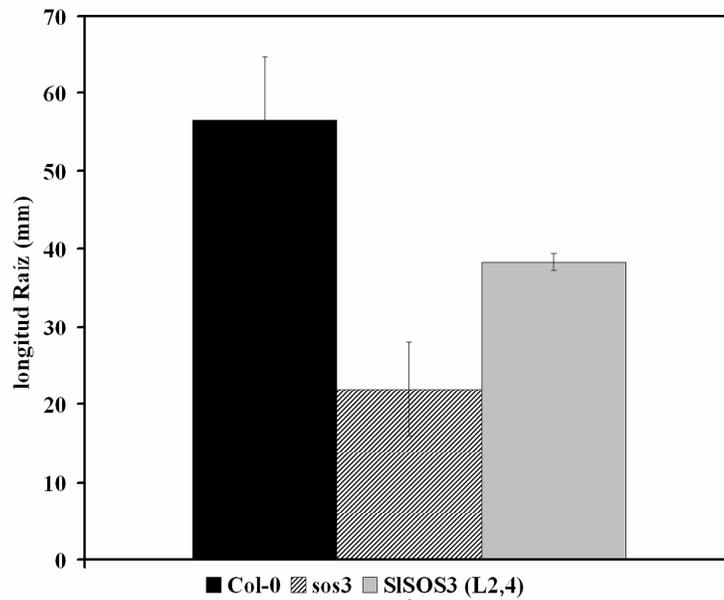
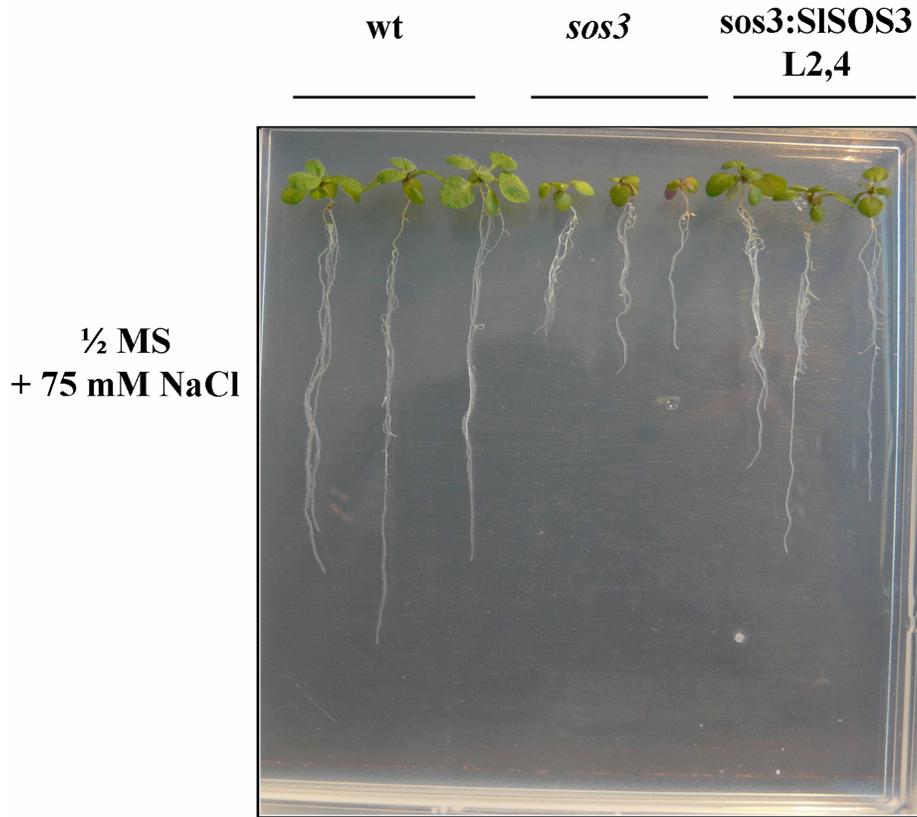


Figura R17. Complementación de los mutantes de *Arabidopsis sos3*. Plántulas crecidas en medio MS durante 4-6 días se transfirieron a medio suplementado con 75 mM NaCl y se midieron después de 7 días de tratamiento. Los datos son media y desviación estándar de al menos 30 plántulas individuales por cada línea.

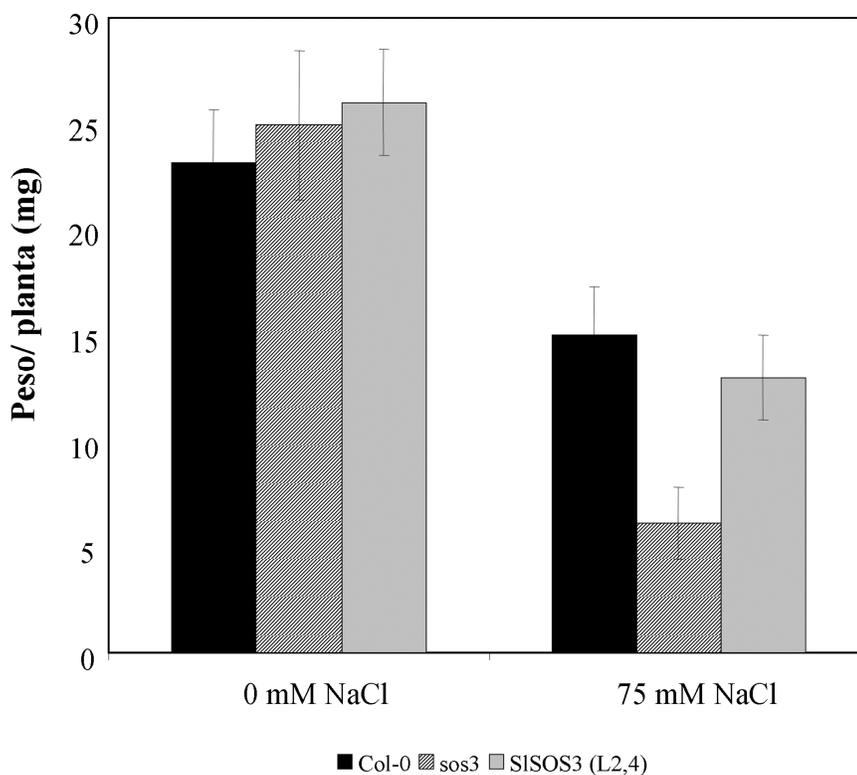


Figura R18. Complementación con *SISOS3* de los mutantes de *Arabidopsis sos3-1*. Plántulas crecidas en medio MS durante 4-6 días se transfirieron a medio suplementado con 75 mM NaCl durante 9 días de tratamiento. Cuantificación del crecimiento de las plántulas expresado como peso fresco por planta en mg. Los datos son media y desviación estándar de al menos 30 plántulas individuales por cada línea.

R.4. Patrón de la expresión de *SISOS1* en función de la especie del tomate

Sobre la base del patrón de expresión de *SOS1* y las características fisiológicas de las plantas *sos1* de *Arabidopsis*, se había propuesto que la expresión de *SOS1* estaba regulado por el estrés salino (Shi et al 2000, Martínez-Atienza et al 2007, Wu et al 2007, Xu et al 2008). Con objeto de estudiar en detalle el patrón de expresión del gen *SISOS1* y de los genes que codifican sus proteínas reguladoras *SISOS2* y *SISOS3*, en respuesta al estrés salino, y a su vez, si este dependía del grado de tolerancia a la sal de la variedad o especie, se llevaron a cabo ensayos de expresión génica por la técnica de *northern blot*, utilizando variedades y especies con diferente grado de tolerancia (**Fig. R19**). Se escogieron en este caso, plantas de dos variedades de *Solanum lycopersicum*, una descrita como sensible, MoneyMaker y una tolerante, Edkawy, así como una

especie silvestre relacionada tolerante, *Solanum pimpinellifolium* (Cuartero y Fernández-Muñoz 1999).

Después de 3 días de tratamiento con NaCl, la expresión de *SISOS1* incrementó en casi todos los tejidos analizados de ambas especies, concretamente en hojas y raíces. Solamente en tallo de MoneyMaker, la variedad sensible de *S. lycopersicum*, la expresión se redujo después de un día del tratamiento, incrementando levemente al tercer día de tratamiento. Comparando ambas especies, el nivel de la transcripción fue cuantitativamente más alto en hoja, pero similar en la raíz de *S. pimpinellifolium*. En el caso de *SISOS2*, el mensaje se expresó fuertemente y de manera constitutiva en todos los tejidos de la especie tolerante silvestre con y sin tratamiento, e incrementó marcadamente por efecto del estrés salino en tallo y sobre todo raíz de las especies cultivadas, sobre todo en la variedad Edkawy. *SISOS3* se expresó de forma específica en raíces, pero disminuyó fuertemente con el tratamiento salino tanto en la variedad Edkawy como en la especie silvestre, tolerantes. Estos resultados sugieren un papel relevante de los genes de la ruta SOS en la tolerancia del tomate a la salinidad.

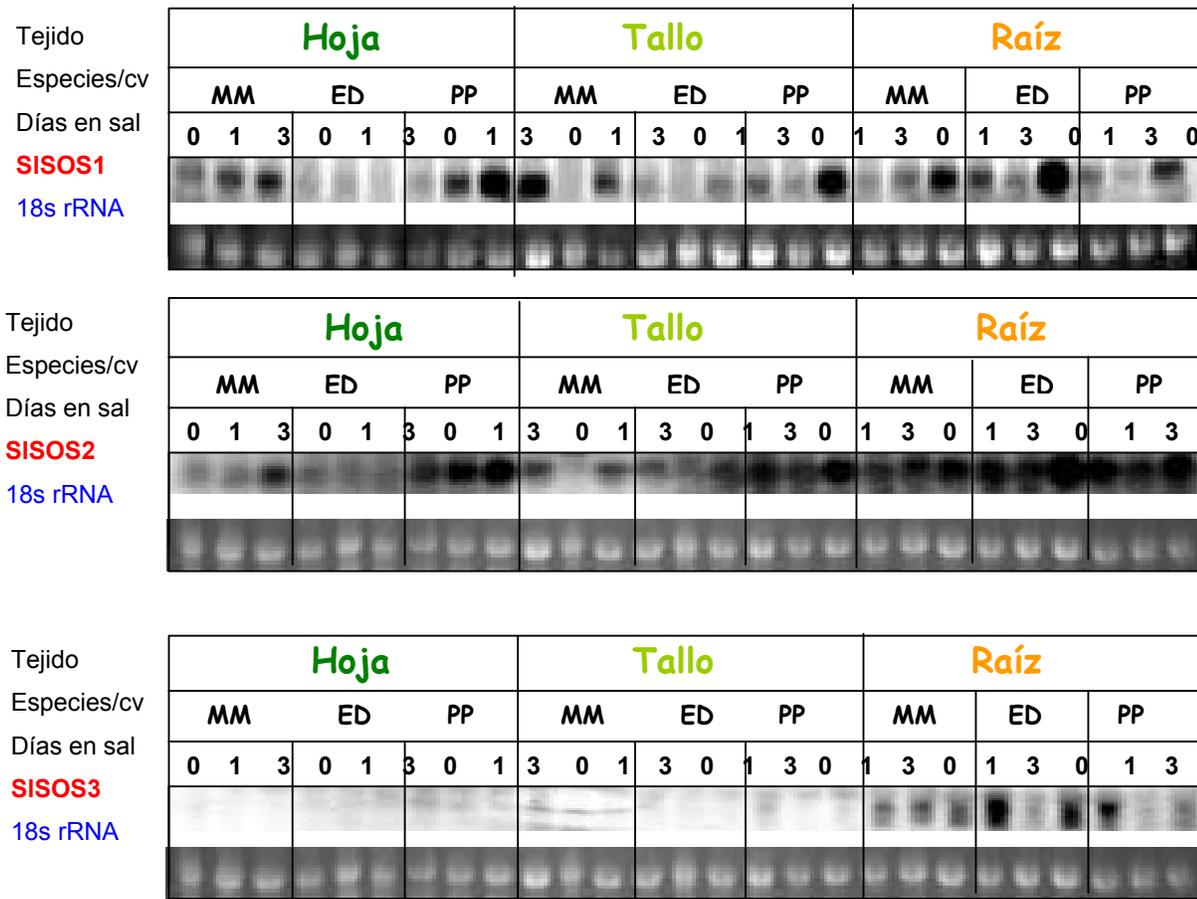


Figura R19. Análisis por Northern-blot de la expresión génica de *SISOS1*, *SISOS2* y *SISOS3* en diferentes variedades y especies de tomate que difieren en el grado de tolerancia a la salinidad, tratadas durante 3 d con 225 mM NaCl. Moneymaker (MM) y Edkawy (ED) son variedades cultivadas de *Solanum lycopersicum* y *Solanum pimpinellifolium* acc. PE-2 (PP) una especie silvestre relacionada. Se aisló ARN total raíces, tallos y hojas de plantas de de las diferentes especies y variedades de tomate crecidas como se ha descrito en Material y Métodos, y tratadas durante 0, 1 ó 3 días con 225 mM NaCl. La carga de cada muestra de ARN se normalizó por la tinción de la banda de 18S rDNA con bromuro de etidio. La figura es representativa de dos experimentos llevados a cabo por duplicado.

R.5. Silenciamiento de *SISOSI* en tomate

Se ha llevado a cabo el silenciamiento de *SISOSI* por transformación estable mediada por *Agrobacterium* mediante la utilización del vector pKannibal/pART27 que porta un fragmento con la repetición invertida del gen blanco (Wesley et al. 2001). Como se indicó en el **apartado M.7.2.**, la transformación de cotiledones y la regeneración de plantas se llevó a cabo siguiendo básicamente el método descrito por Ellul et al. (2003). Se llevaron a cabo 7 experimentos independientes de transformación de cotiledones de tomate con *Agrobacterium* portando la construcción de silenciamiento para *SISOSI* (**Fig. R20**). En total se usaron para la transformación 800 segmentos de cotiledones, a partir de los cuales se regeneraron 28 plantas, que fueron analizadas por PCR utilizando ADN genómico y cebadores específicos que anidaban al gen de resistencia a kanamicina presente en el ADN-T, con el fin de comprobar la presencia de la construcción de silenciamiento para el gen *SISOSI*. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de la construcción génica utilizada en 14 de las 28 plantas regeneradas (en la **Fig. R21**, se muestra el resultado para 4 de las líneas transformantes primarias).

Con la finalidad de determinar el nivel de silenciamiento del gen *SISOSI* en las distintas líneas transgénicas se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa en 3 líneas elegidas al azar de las 14 que portaban la construcción. Se llevaron a cabo tres reacciones de RT-PCR por cada muestra de RNA y dos extracciones de RNA para cada línea transgénica. Los niveles de silenciamiento del gen fueron aproximadamente del 70% para la línea 1 (L1), el 40% para la línea 2 (L2) y el 60% para la línea 3 (L3) (**Fig. R22**).

Para evaluar el efecto que el silenciamiento del gen *SISOSI* pudiera tener sobre el crecimiento de las plantas transgénicas, se utilizaron líneas heterocigotas F1. De este modo se observó que el tratamiento con 100 mM NaCl durante 5 días, influyó muy negativamente sobre el crecimiento de las líneas silenciadas en comparación con las crecidas bajo condiciones normales. La reducción del crecimiento fue del 67% para L1, el 57% para L2 y el 75% para L3, mientras que en el caso de las plantas no transformadas fue tan solo 16% (**Fig. R23**). Estos resultados aportaron los primeros indicios de la relevancia de *SISOSI* frente al estrés salino.

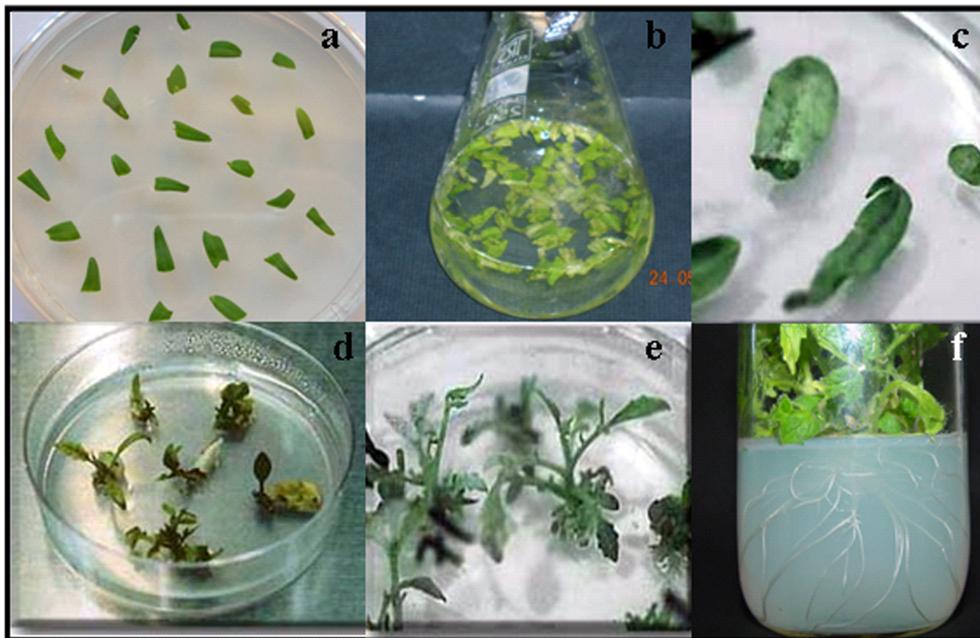


Figura R20. Obtención de plantas de tomate transgénicas: a) segmentos de cotiledones aislados de plántulas cultivadas en GM durante 14 días e incubadas en placa de Petri con medio PCM; b) cocultivo de los segmentos de cotiledones y *Agrobacterium* en medio CCM; c) generación inicial del callo en el cotiledón. La formación del callo normalmente ocurre donde se produjo la herida y se forma como resultado de la estimulación del crecimiento provocado por la zeatina; d) cultivo de los cotiledones incubados con *Agrobacterium* en medio de organogénesis y selección de transformantes (SIM-K); e) generación de raíces. Una vez que los tallos tiene suficiente porte se separan de los callos y se pasan a un medio de inducción de raíces, este no lleva zeatina, pero contiene Kanamicina para la selección de los transformantes; f) transformantes primarios en medio selectivo con kanamicina. Estos se pasaran a macetas.

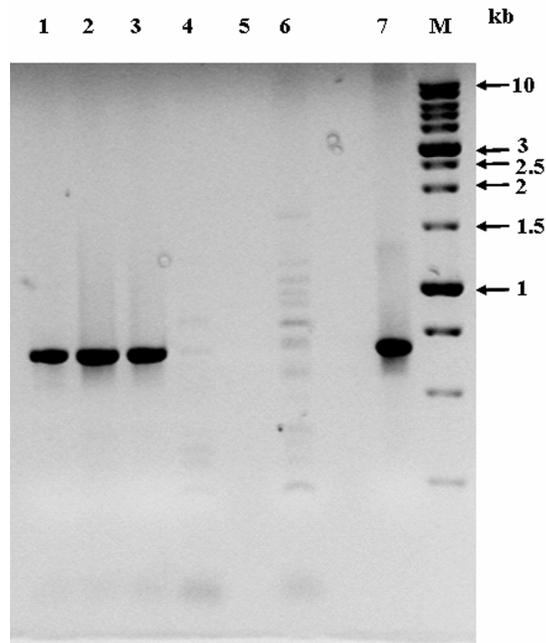


Figura R21. Detección de la construcción para el silenciamiento de *SISOS1* en plantas de tomate. Electroforesis de los productos de PCR con cebadores específicos para el gen de resistencia a kanamicina y ADN genómico de las líneas L1, L2, L3 y L4 (1-4), blanco (5), de una planta no transformada (6), del plásmido portador de la construcción de silenciamiento (7), marcador (M).

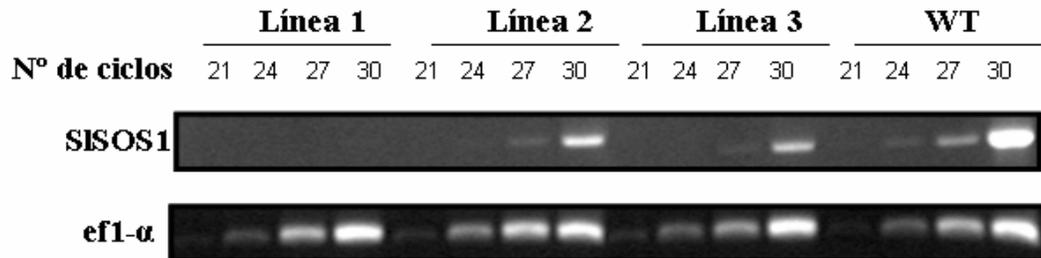


Figura R22. Niveles de transcrito de *SISOS1* en las plantas de tomate transformadas y plantas no transformadas (WT). Las plantas transgénicas de tomate con expresión reducida de *SISOS1* fueron generadas mediante PTGS usando un sistema de expresión estable de RNAi. El nivel de la expresión fue estudiado por RT-PCR semicuantitativa a partir del ARN total aislado de las hojas procedentes de transformantes primarios y oligo dT como cebador para la reacción de RT, utilizando en la PCR subsiguiente una pareja de cebadores específicas para el gen *SISOS1* (panel superior) y otra para el gen control, factor de elongación de tomate, *ef1-α* (panel inferior) (apartado M.7.6.).

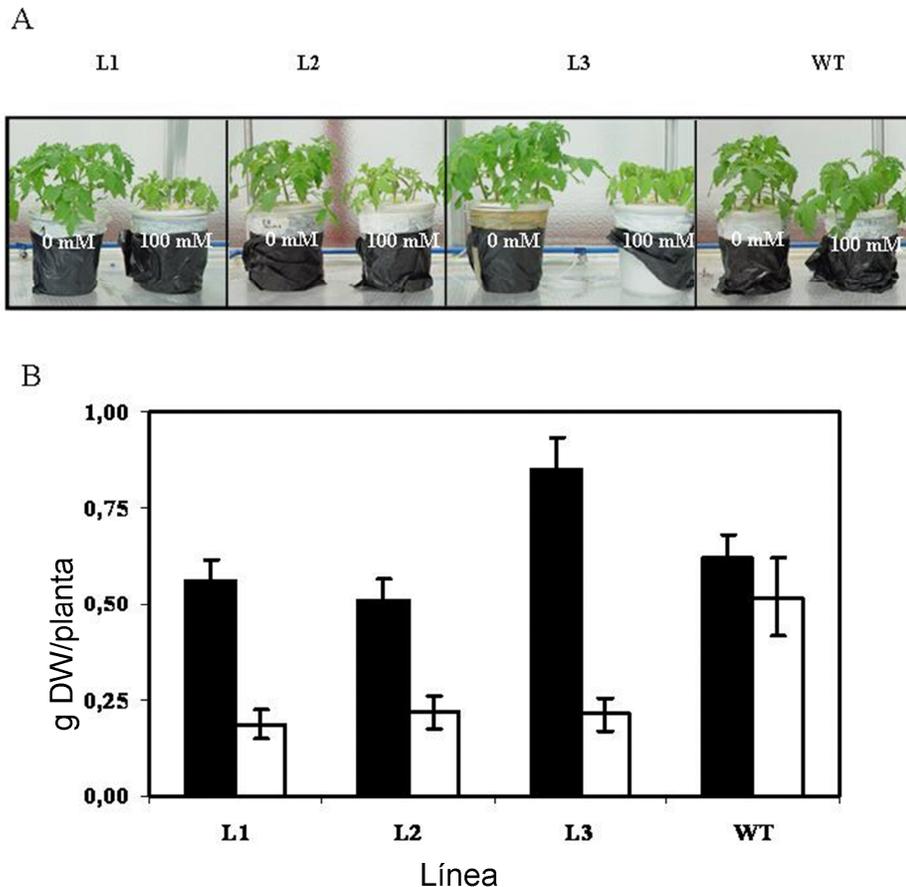


Figura R 23. A. Efecto del silenciamiento del *SISOS1* sobre el crecimiento de las líneas F1 silenciadas de tomate en respuesta al estrés salino. **B.** Crecimiento de las líneas transformadas F1 (L1, L2 y L3) y no transformadas (WT) con la construcción de silenciamiento del gen *SISOS1*, cultivadas en sistema hidropónico y sometidas al tratamiento salino durante 5 días con 0 (■) o 100 mM de NaCl (□). Los valores de peso seco (DW), expresado en g/planta, son las medias \pm SD, de al menos 3 experimentos independientes, usando 8 plantas por línea y por tratamiento.

Para confirmar el patrón de expresión de *SISOS1* en plantas F1, se estudiaron los niveles de transcrito mediante RT-PCR semicuantitativa. Como puede observarse en la **Figura R24**, la señal obtenida para *SISOS1* tras 30 ciclos de amplificación fue muy baja con respecto al control en las tres líneas transgénicas estudiadas (L1, L2, L3), variando los niveles de expresión entre los diferentes tejidos. En el caso de hoja, se observó una reducción del nivel de la transcripción de *SISOS1* en plantas transgénicas silenciadas y ninguna variación en los niveles bajo tratamiento salino. Sin embargo en raíces, la reducción observada en el nivel de la transcripción de *SISOS1* en las líneas

silenciadas, no fue tan alto como en los demás tejidos. En la línea no transformada (WT) se observó un incremento significativo del nivel de transcripción en hoja y sobre todo en raíz por efecto del estrés salino, lo que estuvo de acuerdo con el incremento en el nivel de transcrito observado por *northern blot* en tomate WT tratadas durante 3 días con 225 mM NaCl (**Fig. R24**). Estos resultados confirmaron una vez más la regulación de la transcripción de *SISOS1* por el estrés salino.

Teniendo en cuenta los niveles de mensajero obtenidos en los tejidos analizados en todos los experimentos realizados, se estableció que el nivel de silenciamiento en estas líneas heterocigóticas F1 fue similar a los valores obtenidos en la F0. La línea transgénica L1 mostró la mayor inhibición del desarrollo cuando era cultivada a 100 mM NaCl y ello se asociaba al mayor nivel de silenciamiento de *SISOS1* (~70%) (**Figs. R22, R23 y R24**). Por ello, las semillas F2 de la línea L1 seleccionadas en kanamicina se emplearon en experimentos posteriores donde se estudiaron diferentes parámetros fisiológicos.

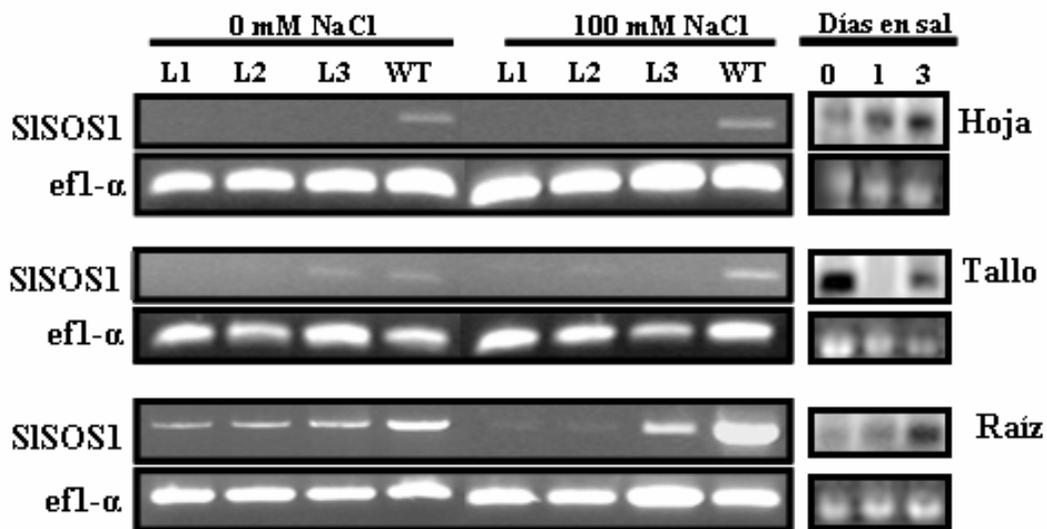


Figura R24: Efecto del silenciamiento del *SISOS1* sobre la abundancia de transcrito de *SISOS1* de las líneas F1 silenciadas de plantas de tomate sometidas durante 5 días con 100 mM de NaCl en cultivo hidropónico. L1, L2 y L3 son líneas de tomate con un silenciamiento parcial de *SISOS1* y WT, no transformadas. El nivel de transcrito fue analizado por RT-PCR semicuantitativa a partir del ARN total de hoja, tallo y raíz a 30 ciclos de PCR, usando cebadores indicados en **apartado M.7.6**. El factor de elongación de tomate, *efl-α*, se utilizó como gen control. La figura es representativa de dos experimentos llevados a cabo por triplicado. Para propósitos comparativos, se indica a la derecha el análisis de la expresión de *SISOS1* por Northern blot en la variedad Moneymaker, tomada de la **Figura R19**.

R.4.1. Análisis del crecimiento de las plantas silenciadas en SISOS1 en condiciones de estrés salino.

En primer lugar y con el fin de completar la información existente sobre la influencia del silenciamiento de *SISOS1* sobre el desarrollo de la planta bajo condiciones de estrés salino, se analizó la velocidad relativa de crecimiento (RGR –*relative growth rate*-), que es el incremento en peso de la planta en función del tiempo analizado y permite evaluar las diferencias en el crecimiento debidas al tratamiento (Hunt 1982). La salinidad no causó ningún efecto sobre el RGR en las plantas control, que parecían crecer de igual forma sin importar el tratamiento. Sin embargo, las plantas silenciadas mostraron un menor desarrollo después de 5 días bajo condiciones control y especialmente, después de ser tratadas con sal. La diferencia en el RGR entre plantas control y silenciadas era más alta cuando las plantas eran sometidas a estrés salino, siendo aproximadamente 5 veces más bajo en el caso las plantas silenciadas (Fig R25).

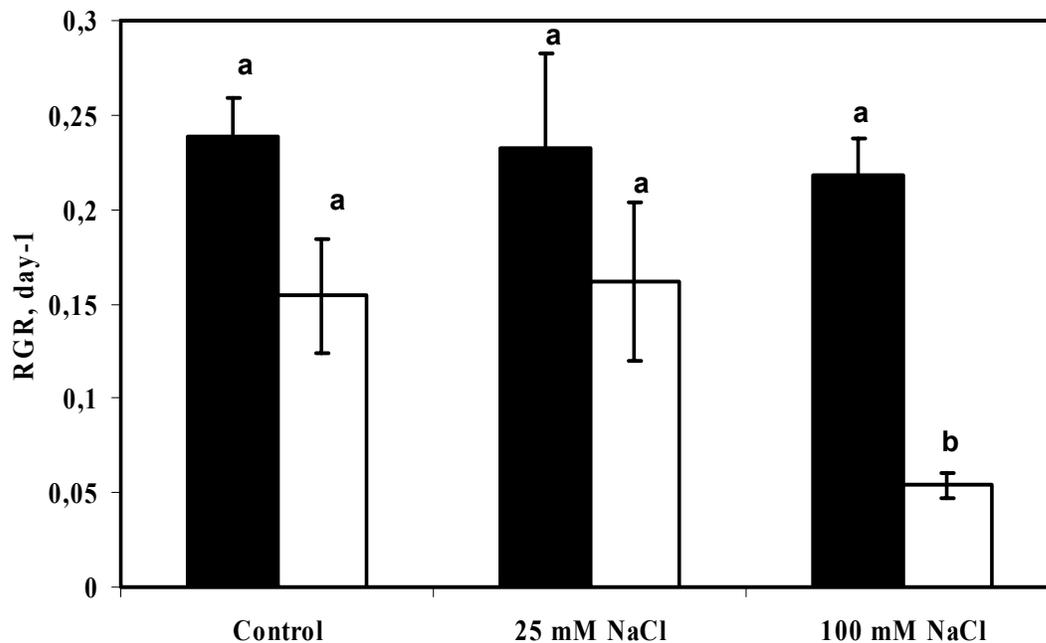


Figura R25. Velocidad de crecimiento relativo (RGR) en plantas T2 no transformadas (■) y silenciadas L1 (□) medidas en condiciones normales de cultivo hidropónico y tratadas durante 5 días con las concentraciones indicadas de NaCl. RGR se expresa como día⁻¹ y se calculó después de 5 días de tratamiento. Los valores son medias ± DS de al menos 5 experimentos independientes usando un mínimo 8 plantas por línea y por tratamiento. Valores seguidos de diferentes letras difieren significativamente (Test de Duncan, P=0.05).

R.4.2. Determinación de la actividad antiportadora Na^+/H^+ en vesículas de membrana plasmática.

Con el fin de comprobar si el silenciamiento de *SISOS1* se correlacionaba con una reducción proporcional en la actividad de intercambio Na^+/H^+ de membrana plasmática catalizado por SISOS1, se purificaron por partición de fases en un sistema de PEG-Dextrano, vesículas enriquecidas en membrana plasmática de raíces de plantas L1-silenciadas y control tratadas durante 3 días con 100 mM NaCl. Dichos tratamientos se aplicaron para conseguir la expresión máxima de SISOS1 (Qiu et al 2002, **Fig. R19 y R24**).

Tabla R1. Evaluación de la pureza de las fracciones enriquecidas en membrana plasmática aisladas de raíces de plantas de la var. *MoneyMaker* no transformadas (WT) y transgénicas silenciadas (L1), tratadas durante 3 días con 150 mM de NaCl, utilizando inhibidores específicos de actividades de transporte de H^+ dependiente de ATP, de diferentes orígenes subcelulares. Las reacciones llevaron a cabo como se indica en el **apartado M.7.8.** a pH 6.5 en presencia de 25 mM KCl. La actividad transportadora de H^+ , dependiente de ATP, se calculó como la velocidad inicial de extinción de la fluorescencia del ACMA, expresada en $\Delta F \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ (entre paréntesis). Los resultados, expresados en porcentaje de actividad específica respecto a la del control, son representativos de uno de dos experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

Inhibidores	Actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP	
	WT	L1
Control	100 (380 ± 23)	100 (185 ± 5)
Na_3VO_4 (250 μM)	44	40
NaN_3 (2 mM)	104	99
Bafilomicin (20 nM)	100	100
Na_2MoO_4 (100 μM)	99	98

Como medida de pureza, las preparaciones de plasmalema obtenidas a partir de microsomas de raíz se caracterizaron utilizando inhibidores específicos para las actividades de transporte de H^+ dependientes de ATP de diferentes orígenes subcelulares (**Tabla R1**). Los inhibidores utilizados fueron vanadato (VO_4^{3-}), un inhibidor específico de P-ATPasas de membrana plasmática, bafilomicina, inhibidor específico de la V- H^+ -ATPasa de vacuolas, la azida (N_3^-), inhibidor de las F- H^+ -

ATPasas de cloroplasto, y molibdato, inhibidor de las PPasas solubles (Ballesteros et al 1996 y 1998). La actividad transportadora de H^+ se inhibió fundamentalmente por vanadato, lo que unido a una casi nula inhibición por bafilomicina, azida y molibdato confirmó que la preparación de vesículas estaba altamente enriquecida en membrana plasmática con una escasa contaminación por otro tipo de membranas.

La detección del intercambio entre Na^+ y H^+ en las vesículas de membrana requirió previamente la creación de un gradiente de pH, utilizándose para ello la actividad transportadora de H^+ asociada a la P- H^+ -ATPasa, determinada como la extinción de la fluorescencia de la sonda ACMA (**Fig. R26**). La actividad transportadora de H^+ fue significativamente menor en el caso de las raíces de plantas L1-silenciadas que en las plantas WT (**Fig. R26A, Tabla R1**), lo cual sugiere que el silenciamiento de *SISOS1* afectaría también a la actividad de transporte de H^+ dependiente de ATP. Una vez alcanzado el estado estacionario de ΔpH (la velocidad de entrada de H^+ se iguala con la de salida), la adición de sales de sodio (Na_2SO_4) resultó en una recuperación de la fluorescencia, o disipación del gradiente de pH, que indicaba un eflujo de H^+ dependiente de la entrada de Na^+ en las vesículas. Tanto en las vesículas de plantas WT como en las silenciadas, los niveles de recuperación de fluorescencia incrementaron con la concentración de Na^+ en el medio. Esta recuperación de la fluorescencia fue significativamente inferior en las membranas de las raíces de las plantas L1-silenciadas. Esta actividad de intercambio de Na^+ por H^+ fue claramente inferior en las vesículas de raíces de plantas L1-silenciadas a todas las concentraciones probadas (**Fig. R26B**). Los resultados obtenidos confirman la reducción de la expresión de *SISOS1* en las plantas L1-silenciadas, lo cual nos permitía continuar el abordaje con mayor profundidad de la función de *SISOS1* en plantas de tomate sometidas a estrés salino y la relevancia de su papel en la distribución de Na^+ y K^+ en la planta completa.

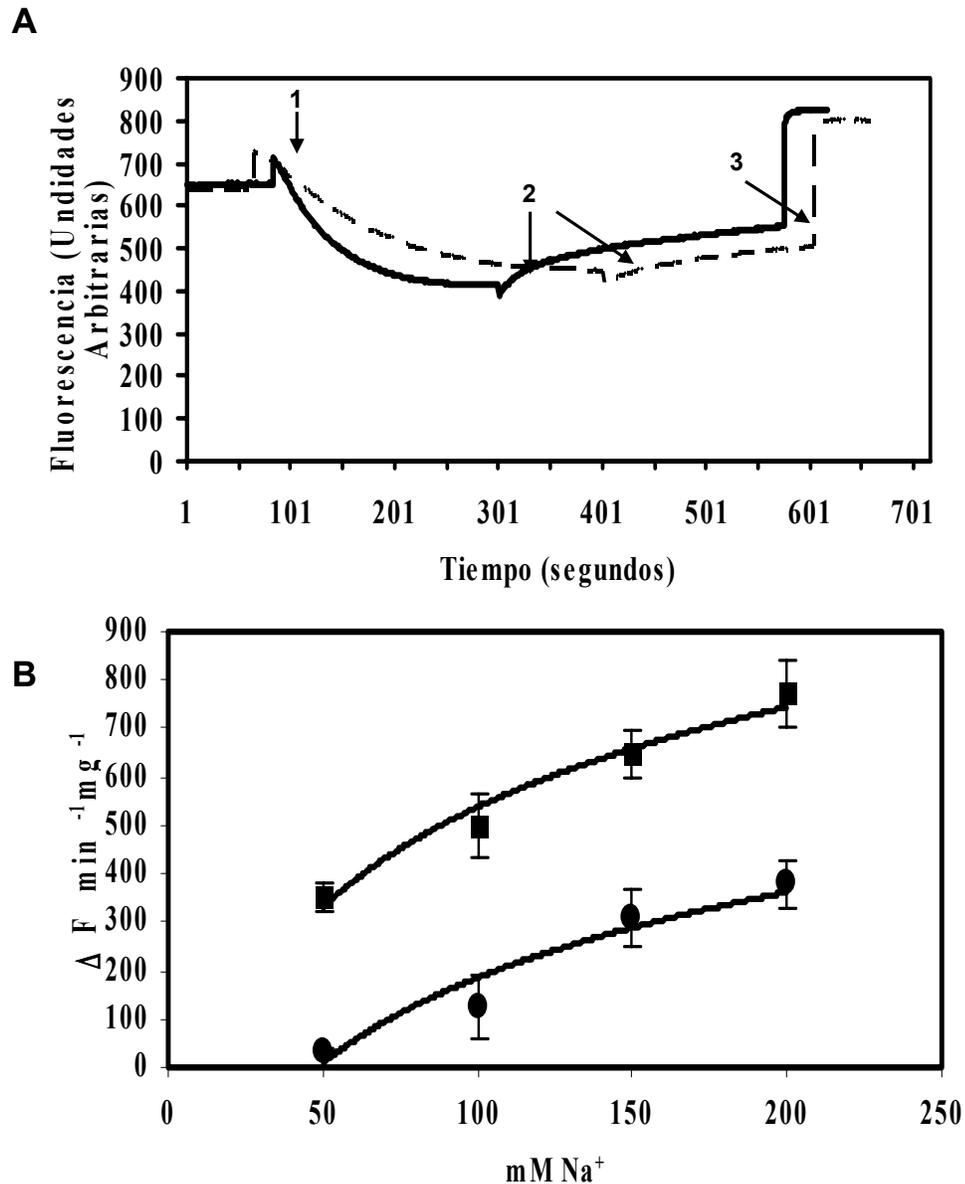


Figura R26. Actividad de intercambio Na^+/H^+ en vesículas de membrana plasmática de raíces de plantas silenciadas para *SISOS1* (L1) y no transformadas (WT) tratadas durante 3 días con 100 mM NaCl. **A.** Disipación por Na^+ del gradiente de pH generado por la H^+ -ATPasa de plasmalema, medida como recuperación de la fluorescencia del ACMA, en vesículas enriquecidas en plasmalema aisladas de la línea silenciada L1 (trazo discontinuo) y WT (trazo continuo). Las flechas indican adición de (1) 1.5 mM MgSO_4 , (2) 50 mM Na_2SO_4 and (3) 10 mM NH_4SO_4 . La fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias. **B.** Actividad de intercambio Na^+/H^+ ($\Delta F \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína) medida en función de la concentración de Na^+ en el medio de ensayo, en vesículas enriquecidas en plasmalema aisladas de raíces de plantas silenciada L1 (círculo) y WT (cuadrados). Cada punto corresponde a la media de tres ensayos \pm SD.

R.4.3 Análisis del contenido de Na⁺ y K⁺ en plantas cultivadas en condiciones de estrés salino.

Para comprobar si las diferencias fenotípicas descritas anteriormente se relacionaban directamente con diferencias en los contenidos iónicos, se determinaron los contenidos de Na⁺ y K⁺ de las plantas silenciadas L1 y WT sometidas durante 5 días a un tratamiento salino moderado (25 mM NaCl) y severo (100 mM NaCl). A 3 y 5 días de cultivo con un tratamiento de 25 mM de NaCl, que es considerado como un tratamiento moderado para el tomate, la línea silenciada L1 mostró contenidos de Na⁺ mayores al de las plantas WT en hojas y raíces pero no en tallo (**Figs. R27-29**). Esto era esperable dado el papel que tiene el transportador SOS1 en la extrusión de Na⁺ en raíces (Shi et al 2002), que quedaría prácticamente anulado en las plantas silenciadas L1. Con 100 mM de NaCl, ya un día después de aplicar el tratamiento, los contenidos de Na⁺ fueron también mayores en hojas y raíces de las plantas silenciadas, pero significativamente inferiores en el tallo.

Es interesante destacar el hecho de que el contenido en Na⁺ del tallo de las plantas silenciadas permanecía prácticamente inalterable independientemente del tratamiento aplicado al medio de cultivo hidropónico, mientras que en las plantas WT se doblaban los contenidos de Na⁺ cuando el tratamiento era de 100 mM NaCl en relación con el tratamiento de 25 mM NaCl (contenido en Na⁺ 5-6% frente a 2.5-3%; **Fig R28**). Asimismo, fue destacable que a 25 mM NaCl, la mayor acumulación de Na⁺ en las plantas WT ocurriera en el tallo en cualquier punto del tratamiento, mientras que en las plantas silenciadas existía una deposición preferencial en las raíces, especialmente en los últimos días de tratamiento (**Fig. R29**). En conjunto, todos estos datos indicaban que SOS1 está implicado en el movimiento del Na⁺ de la raíz al tallo, presumiblemente en la carga xilemática (Shi et al. 2002).

Asimismo, se analizó la concentración del K⁺ dada la conocida implicación de SOS1 en la nutrición de este catión (Wu et al., 1996). La acumulación de K⁺ en la planta completa fue menor en las plantas tratadas con NaCl que en las cultivadas en condiciones control después de cinco días de tratamiento, tanto en condiciones de estrés moderado (25 mM NaCl) como severo (100 mM NaCl). Sin embargo, mientras que las diferencias en el contenido de K⁺ en la parte aérea eran prácticamente inapreciables entre las líneas suprimidas y las no transformadas, en la raíz fueron extraordinarias

(Figs. R30 y R31). Las raíces de las plantas silenciadas L1 tratadas durante 3 días de tratamiento con 25 mM NaCl mostraron una fuerte disminución en los contenidos de K^+ , cosa que no ocurría en las raíces de plantas WT. Bajo un estrés severo (100 mM NaCl), tanto las raíces de las plantas WT como las silenciadas mostraron una pérdida de K^+ después de 3 días de tratamiento. Sin embargo, tras 5 días de tratamiento, el contenido de este catión en las plantas silenciadas fue significativamente menor al de las plantas WT (Fig. R31).

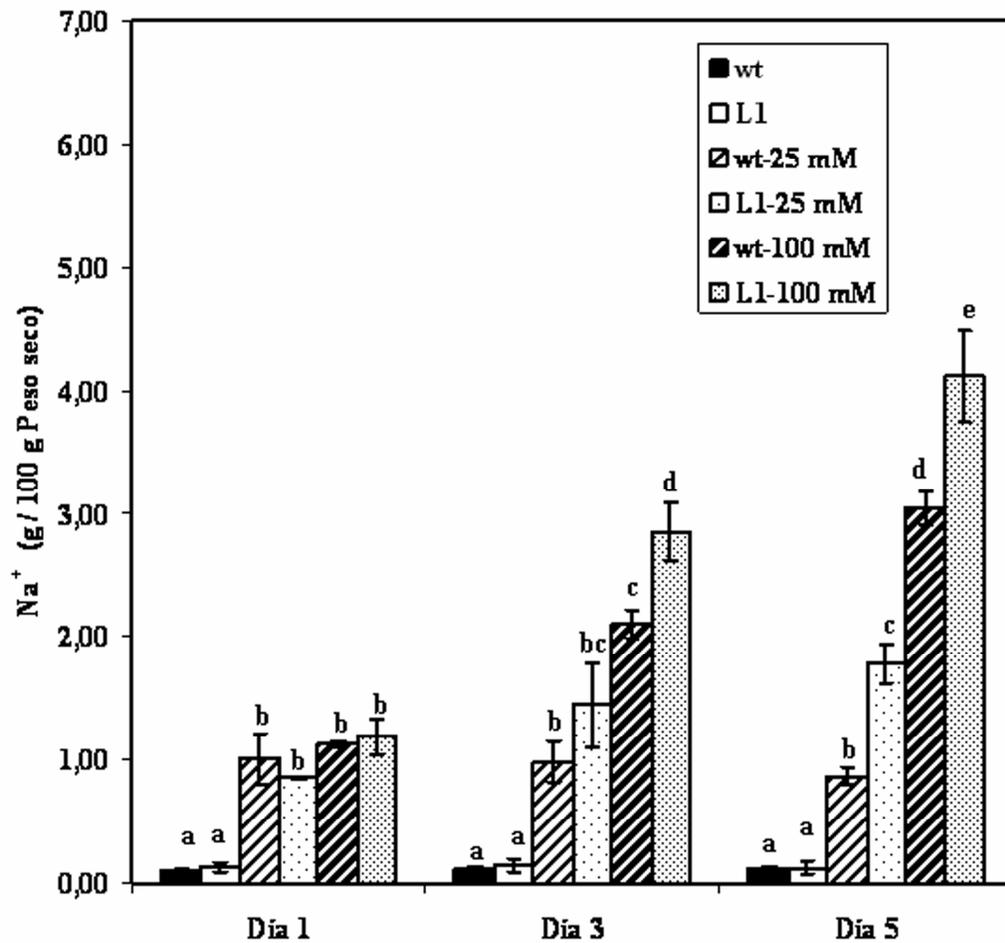


Figure R27. Contenido Na^+ en hoja de plantas control (WT) y con *SISOS1* silenciado (L1). Las plantas se cultivaron en medio hidropónico con una solución nutritiva control o suplementada con distintas concentraciones de NaCl (25 y 100 mM). Se cosecharon en tres puntos a lo largo del tratamiento (Día 1, 3 y 5). Los datos son medias de $\pm SD$ al menos 3 experimentos independientes usando como mínimo 8 plantas por línea y tratamiento. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes (Duncan test, $P=0.05$).

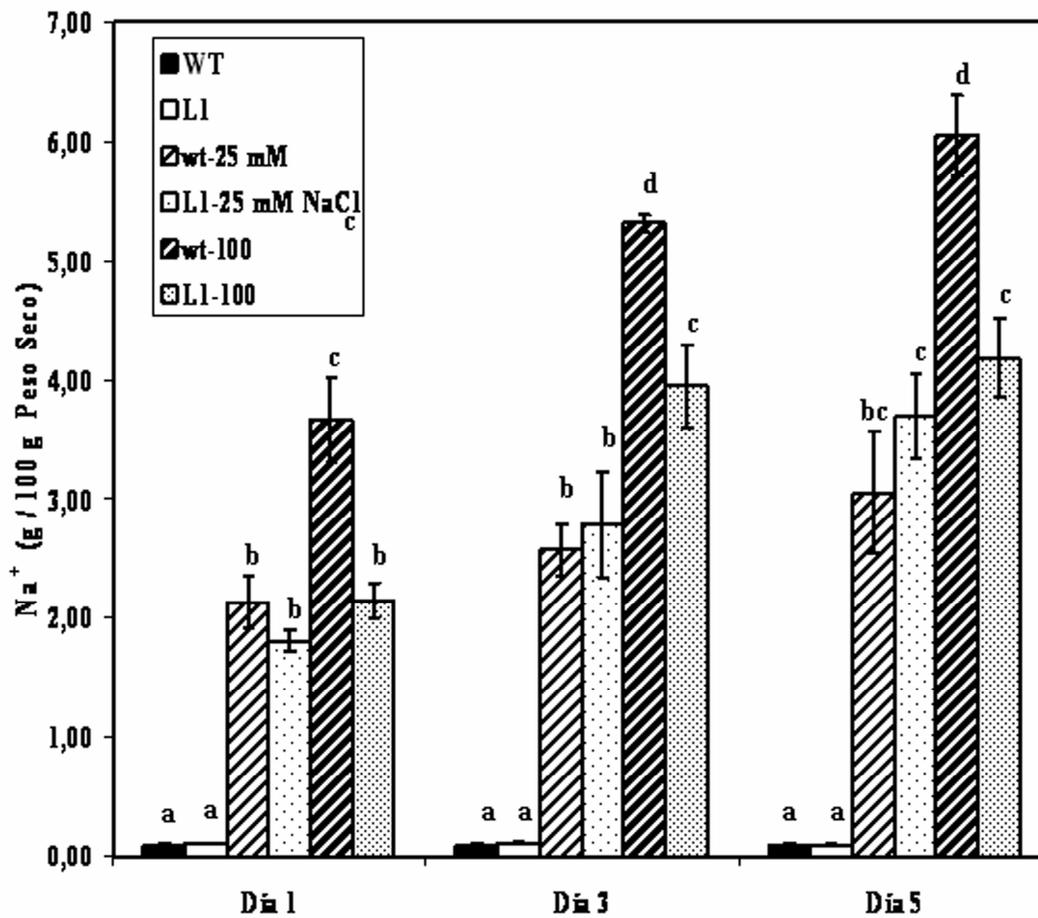


Figure R28. Contenido Na⁺ en tallo de plantas no transformadas (WT) y con *SISOS1* silenciado (L1). Las plantas se cultivaron en medio hidropónico con una solución nutritiva control o suplementada con distintas concentraciones de NaCl (25 y 100 mM). Las plantas se colectaron en tres puntos a lo largo del tratamiento (Día 1, 3 y 5). Los datos son medias de \pm SD al menos 3 experimentos independientes utilizando un mínimo de 8 plantas por línea y tratamiento. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes (Test de Duncan, $P = 0.05$).

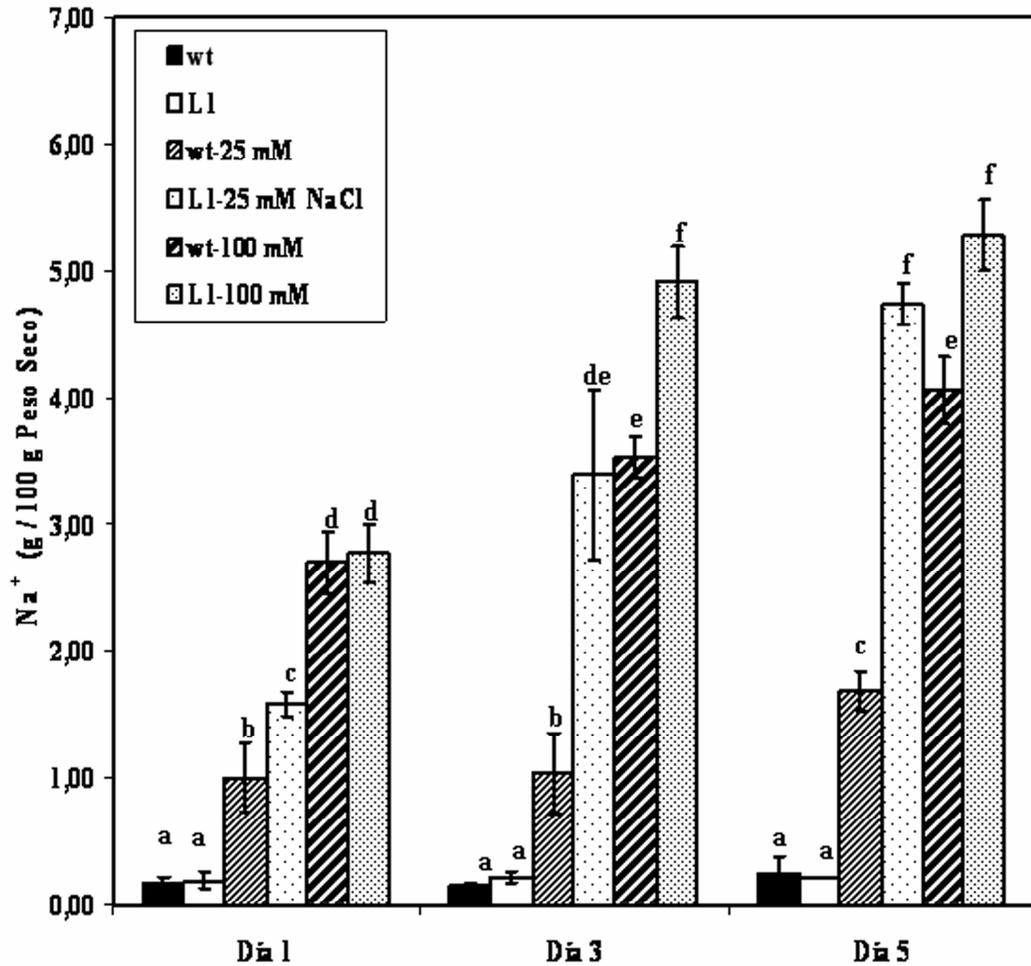


Figure R29. Contenido Na^+ en raíz de plantas no transformadas (WT) y con *SISOS1* silenciado (L1). Las plantas se cultivaron en medio hidropónico con una solución nutritiva control o suplementada con distintas concentraciones de NaCl (25 y 100 mM). Las plantas se colectaron en tres puntos a lo largo del tratamiento (día 1, 3 y 5). Los datos son medias de \pm SD al menos 3 experimentos independientes utilizando un mínimo de 8 plantas por línea y tratamiento. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes (Test de Duncan, $P=0.05$).

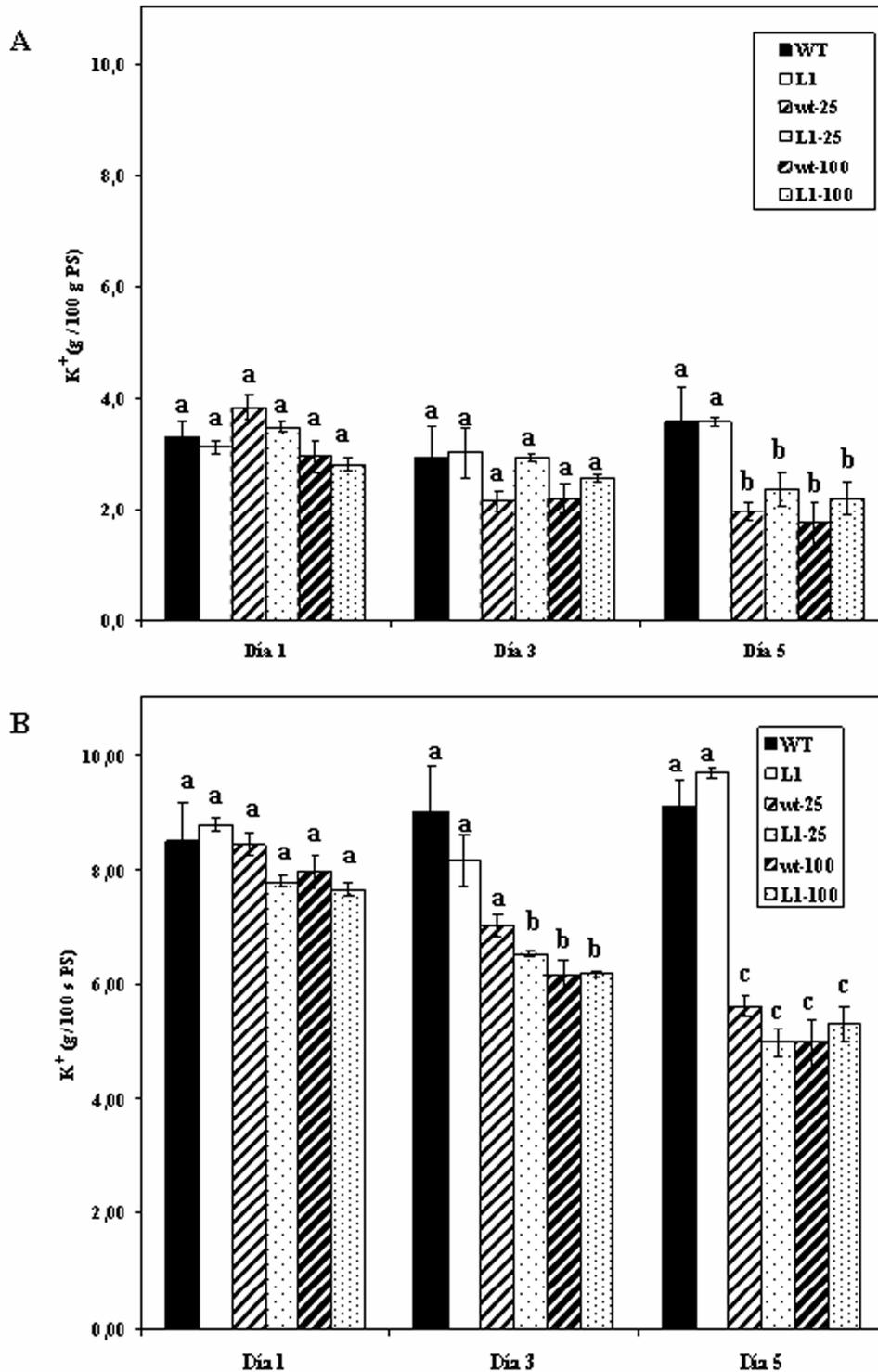


Figure R30. Contenido K^+ en hoja (A) y tallo (B) de plantas no transformadas (WT) y con *SISOS1* silenciado (L1). Las plantas se cultivaron en medio hidropónico con una solución nutritiva control o suplementada con distintas concentraciones de NaCl (25 y 100 mM). Las plantas se colectaron en tres puntos a lo largo del tratamiento (día 1, 3 y 5). Los datos son medias de \pm SD al menos 3 experimentos independientes utilizando un mínimo de 8 plantas por línea y tratamiento.).

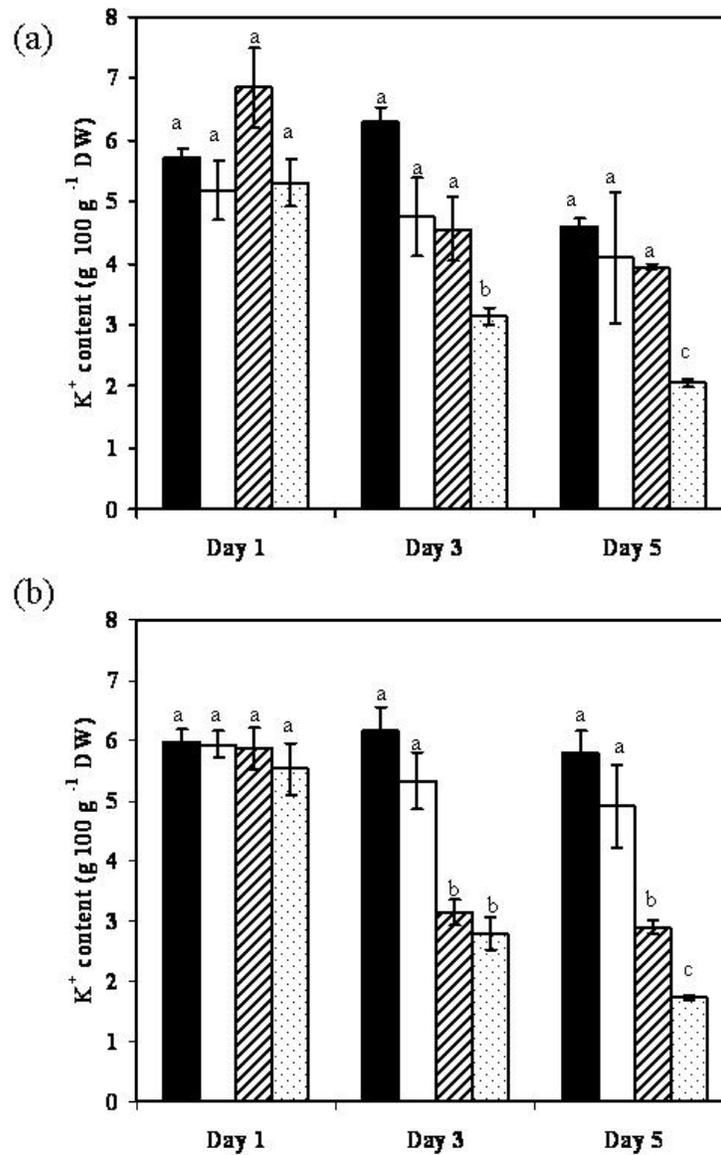


Figura R31. Contenido de K^+ en raíces de plantas de tomate no transformadas (WT) y silenciadas (LI) sometidas a estrés salino moderado y severo. El contenido iónico se determinó en raíces de plantas cultivadas con una solución nutritiva control o suplementada con una concentración de 25 mM (a) o 100 mM NaCl (b). Barras negras corresponde a WT en condiciones control, barras blancas LI en condiciones control, Barras rayadas WT sometidas a tratamiento salino, Barras punteadas LI sometidas a tratamiento salino. Los datos son medias de \pm SD de al menos 3 experimentos independientes utilizando un mínimo de 8 plantas por línea y tratamiento. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes (Test de Duncan, $P=0.05$).

Para cuantificar la absorción neta de iones en la planta entera (el balance entre el influjo y eflujo total), y la cantidad que se transloca a la parte aérea, así como la distribución del Na^+ entre los diferentes órganos vegetales, se estimaron tanto la velocidad de entrada en la planta completa (NUR-*net uptake rate*-) como la de translocación de la raíz a la parte aérea (NTR-*net translocation rate*-), tal y como se describen en Taleisnik y Grunberg (1994) y Guerrier (1996). Como era predecible, las plantas silenciadas L1 mostraron un NUR superior al de las plantas WT, ya que tenían comprometida la función de extrusión de Na^+ al medio externo (**Tabla R2**).

La translocación (NTR) del Na^+ desde la raíz a la parte aérea (tallos, peciolo y hojas) fue también mayor en las plantas silenciadas comparadas con las plantas WT en condiciones de salinidad (**Tabla R2**). Sin embargo, el análisis del flujo de Na^+ a cada órgano individualmente mostró que el Na^+ en las plantas silenciadas iba dirigido fundamentalmente hacia las hojas mientras que en las plantas WT se retenía fundamentalmente en el tallo (**Tabla R3**). Aparentemente, los tallos de las plantas silenciadas parecen haber perdido la capacidad de retener Na^+ . Inesperadamente, el flujo neto hacia las raíces fue muy similar para ambos tipos de plantas sometidas a un estrés salino severo, indicando que el gradiente impuesto de 100 mM durante 5 días excedería la capacidad de las raíces para extruir Na^+ al medio con el fin de mantener la homeostasis iónica (Tester y Davenport, 2003). Esta idea viene apoyada además por el mayor contenido de Na^+ en las raíces de plantas control en 100 mM NaCl, comparado con las de 25 mM NaCl, con valores cercanos al de las plantas silenciadas (**Fig. R26**).

El análisis de la entrada neta de K^+ en la planta completa (NUR) mostró valores cercanos a cero tanto en el caso de plantas WT como en el caso de plantas silenciadas en condiciones de estrés salino moderado, sin embargo estos valores eran muy negativos en 100 mM NaCl lo que implicaba una pérdida importante de K^+ en la raíz o eflujo de K^+ (**Tabla R2**). El flujo neto de K^+ a las hojas, tallos y, sobre todo, a raíces de plantas silenciadas fueron menores, incluso negativos bajo un estrés severo, indicando igualmente, una pérdida de K^+ . A este respecto, es usual que el estrés salino provoque pérdidas de K^+ en la célula (Shabala et al. 2005). En el caso de las plantas silenciadas, donde el mecanismo de extrusión de Na^+ al medio externo está limitado, dicha pérdida de K^+ parece todavía mayor.

Con el fin de ahondar aún más en el mecanismo de transporte de Na^+ a larga distancia en las plantas sometidas a estrés salino y la implicación de SISOS1 en este

proceso, se procedió a estudiar los contenidos de Na^+ y K^+ en la savia xilemática. Tanto en las plantas silenciadas como en las plantas WT se produjo una acumulación de Na^+ como consecuencia del tratamiento salino, siendo siempre las cantidades del ión mayores en el caso de las plantas silenciadas (**Tabla R4**). Sin embargo, los flujos de Na^+ al xilema se redujeron significativamente debido al estrés salino especialmente en la plantas silenciadas, probablemente debido a la fuerte reducción (8 a 15 veces) que experimenta el flujo de savia xilemática en estas condiciones (**Tabla R4**). Para plantas silenciadas y cultivadas durante 3 días en 100 mM NaCl no pudo determinarse el flujo xilemático debido a la ausencia de presión radicular. Para el K^+ se obtuvo el mismo patrón en cuanto a las concentraciones y flujo xilemático (**Tabla R4**). Todos los resultados obtenidos apoyan el papel fundamental de SOS1 en la carga xilemática para transportar el Na^+ a larga distancia en la planta, como se había sugerido previamente en *Arabidopsis* (Shi et al 2002).

Tabla R2. *Velocidad de absorción neta (NUR- net uptake rate) en planta entera y velocidad de translocación neta a parte aérea (NTR- net translocation rate) para K^+ (expresado como $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PS raíz día}^{-1}$) y Na^+ (expresado como $\text{mmol g}^{-1} \text{PS raíz día}^{-1}$) en plantas de tomate MoneyMaker (WT) y silenciadas para SlSOS1 (L1) cultivadas durante 5 días con 25 o 100 mM NaCl. Los valores se obtuvieron de las medias a tiempo de cosecha entre 1 d y 5 d de al menos 8 plantas de un experimento representativo..*

Tratamiento	NUR		NTR	
	WT	L1	WT	L1
<i>Sodio</i>				
Control	-0.17	-0.17	0.09	0.10
25 mM NaCl	0.78	2.68	0.44	1.27
100 mM NaCl	7.35	20.06	4.86	14.11
<i>Potasio</i>				
Control	0.01	0.00	6,45	-6.64
25 mM NaCl	-0.11	-0.08	-344	-171
100 mM NaCl	-3172	-2599	-3.1	-5.70

Tabla R3. Flujo neto de K^+ y Na^+ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{PS día}^{-1}$) a hojas, tallos y raíces en plantas de tomate control (WT) y silenciadas (L1) tratadas con 0, 25, 100 mM NaCl durante 5 días. Los resultados son medias de 12 plantas. Los valores se calcularon para las medias de los datos obtenidos en cada día de cosecha entre los días 1 y 5 de al menos 8 plantas de un experimento representativo.

Ion	Tratamiento NaCl (mM)	Planta	Hoja	Tallo	Raíz
Na⁺	0	WT	29	35	4
		L1	1	-24	2
	25	WT	4	141	57
		L1	156	227	533
	100	WT	46	2002	272
		L1	238	-208	242
K⁺	0	WT	92	514	369
		L1	89	239	119
	25	WT	-143	-161	-139
		L1	-17	-106	-127
	100	WT	-9	121	6
		L1	-82	-105	-142

Tabla R4. Flujo xilemático, concentraciones de Na^+ , K^+ , flujos en el xilema de raíces de plantas control (WT) y silenciadas (LI) cultivadas durante 3 días con 0, 25 or 100 mM NaCl. Los valores son medias \pm SD de 3 plantas. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $P=0.05$). ND: no determinado.

		0		25		100	
		WT	LI	WT	LI	WT	LI
Días en NaCl							
Flujo xilemático ($\text{mL h}^{-1} \text{g}^{-1}$ raíz PF)	1	141 \pm 39e	217 \pm 31f	82.3 \pm 5.0d	10.6 \pm 4.1b	21.5 \pm 8.8c	1.4 \pm 0.6a
	3	48.0 \pm 13.2c	101 \pm 30e	25.1 \pm 11.3bc	6.7 \pm 0.3a	0	0
Sodio en xilema (mM)	1	0.1 \pm 0.1a	0.21 \pm 0.0a	14.4 \pm 3.4b	25.1 \pm 1.6c	73.0 \pm 17d	168 \pm 20e
	3	0.1 \pm 0.1a	0.14 \pm 0.1a	27.2 \pm 2.2b	34.1 \pm 3.6b	ND	ND
Flujo de Sodio al xilema ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ raíz PF)	1	0.01 \pm 0.00a	0.04 \pm 0.02a	1.00 \pm 0.28c	0.27 \pm 0.10b	1.50 \pm 0.21c	0.31 \pm 0.20b
	3	0.01 \pm 0.00a	0.01 \pm 0.00a	0.65 \pm 0.22c	0.23 \pm 0.01b	ND	ND
Potasio en xilema (mM)	1	13.9 \pm 3.5a	9.2 \pm 2.2a	23.1 \pm 10.7ab	48.7 \pm 12.6c	19.4 \pm 9.9ab	49.6 \pm 7.8c
	3	8.58 \pm 1.1a	5.07 \pm 1.91a	25.6 \pm 8.1b	23.1 \pm 5.6b	ND	ND
Flujo de Potasio al xilema ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ raíz PF)	1	1.96 \pm 0.30c	2.01 \pm 0.24c	1.90 \pm 0.35c	0.48 \pm 0.10b	0.38 \pm 0.05b	0.07 \pm 0.04a
	3	0.41 \pm 0.07b	0.54 \pm 0.34b	0.62 \pm 0.21b	0.15 \pm 0.03a	ND	ND

VII. Discusión

La homeostasis iónica es un mecanismo clave en la tolerancia al estrés salino y constituye un proceso global que conlleva el mantenimiento en el citosol de una alta selectividad K^+/Na^+ resultado de la exclusión de iones Na^+ y Cl^- a través del plasmalema y su compartimentación en la vacuola. A nivel molecular, dicho proceso tiene lugar por la acción concertada de transportadores primarios y secundarios ubicados en aquellas membranas bajo el control de un mecanismo de transducción de la señal de estrés salino que coordina dicha respuesta a nivel de célula, tejido y organismo. La reciente identificación de los mutantes *sos* (*salt overly sensitive*) de *Arabidopsis* hipersensibles a la sal ha sido clave en la elucidación de este proceso, ya que ha emergido una nueva e importante ruta reguladora de la homeostasia para el Na^+ y el K^+ bajo condiciones salinas (Zhu 2002). Esta ruta SOS está gobernada por los genes SOS1, que codifica un antiportador Na^+/H^+ de plasmalema, SOS2, una serina/treonina protein kinasa, y SOS3, un sensor de Ca^{2+} , de forma que la activación específica de esta ruta por sal controla el eflujo de Na^+ y su transporte a larga distancia, determinando la tolerancia de *Arabidopsis* a este factor (Zhu, 2002 Shi et al 2002).

Sin embargo, existen importantes limitaciones en el estudio de la homeostasis iónica y en particular del transporte de Na^+ a larga distancia en *Arabidopsis*. La primera es la practica ausencia de tallo, o al menos, tan corto que no permite una disección precisa de los contenidos relativos de Na^+ en tallo con respecto a las hojas, lo que limita el estudio de importantes factores que controlan la homeostasis de Na^+ y K^+ a nivel de organismo bajo condiciones salinas, como son los procesos de reabsorción de Na^+ por el tallo y su redistribución en hojas viejas. (Tester y Davenport 2003). La segunda limitación es que en *Arabidopsis* y otras plantas modelo, como cebada, maíz o arroz no comparten un modelo similar de expresión, regulación y características cinéticas para muchos de los transportadores implicados (Mäser et al 2001, García-deblás et al. 2003, Møller y Tester 2007). Asimismo, las diferencias anatómicas y fisiológicas entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, y sus respuestas fisiológicas diferenciales a la sal (Tester y Bacic 2005, Davenport et al 2005, 2007, Møller y Tester 2007), aconsejan para estas últimas la utilización de un modelo vegetal diferente que permita estudiar las bases moleculares de la homeostasis de Na^+ y K^+ bajo condiciones salinas en especies hortícolas de interés agronómico. A este respecto, el tomate constituye un conveniente y excelente modelo de planta de cosecha que presenta una gran diversidad genotípica en relación a la homeostasia iónica, habiéndose demostrado que el control del transporte a larga distancia durante el estrés salino constituye un importante determinante de su tolerancia

a condiciones salinas, de forma que las más tolerantes acumulan mayor cantidad de sales en tallos y hojas, con una distribución diferencial en hojas viejas, que previenen su acumulación en hojas jóvenes y las más sensibles lo hacen preferencialmente en raíces (Cuartero y Fernández-Muñoz 1999, Cuartero et al 2006, Foolad 2004). La raíz de tomate parece determinar, en una gran medida, las concentraciones de Na^+ que llegan a la parte aérea en función de la intensidad del estrés (Estañ et al 2005), por lo que parece posible la implicación en dicha regulación del módulo funcional de SOS (y/o de transportadores de tipo HKT, los cuales no son objeto de estudio en el presente trabajo de Tesis Doctoral) en las células parenquimáticas que cargan al xilema de raíz y tallo.

Por ello, se ha considerado como objetivo fundamental del presente trabajo, la identificación y caracterización de los ortólogos de los genes de la ruta SOS utilizando un abordaje funcional en levadura e *in planta* (RNAi), en un cultivo como el tomate donde poder estudiar su relevancia en respuesta a la salinidad. La investigación propuesta en tomate es muy oportuna por ser éste un sistema modelo de planta de interés agronómico, de gran relevancia económica nacional e internacional, que ha sido objeto de amplios estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares, los cuales han revelado una gran diversidad genotípica en relación a la salinidad. Asimismo, su fácil manipulación por ingeniería genética, y la existencia de una enorme cantidad de información disponible de los proyectos de secuenciación de ESTs a gran escala (*NSF tomato genome project*, DBI-9872617, <http://www.sgn.cornell.edu>) facilitarán la identificación funcional de los genes de interés.

D.1. *SISOS1*

Desde la identificación en *Arabidopsis* del antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática, *SOS1*, y el establecimiento de su papel crucial en la tolerancia al estrés salino (Shi et al., 2000, 2002, 2003), se han caracterizado funcionalmente, esencialmente en sistemas heterólogos (bacterias y levaduras), varios genes *SOS1* de diferentes orígenes vegetales, como *Oryza sativa*, *Cymodocea nodosa*, *Populus euphratica*, *Thellungiella halophila* y *Triticum aestivum*, confirmándose la presencia de este antiportador en glicófitas y halófitas (Martinez-Atienza et al. 2007, Garcíadeblas et al. 2007, Wu et al. 2007, Oh et al. 2007, Xu et al 2008). En el presente trabajo, se ha aislado, clonado y caracterizado funcionalmente *in planta*, mediante silenciamiento génico estable (RNAi), el gen *SOS1* de tomate, evidenciándose su importancia en la

tolerancia a la sal en una especie de interés agronómico y su papel en la distribución iónica en la planta.

La secuencia aminoacídica codificada por *SISOS1* exhibe una alta homología con las secuencias descritas de especies vegetales, sobre todo con las de dicotiledóneas (**Fig. R3C**), y comparte con todas ellas todas sus características comunes: 12 dominios transmembrana, una larga cola C-terminal cara al citoplasma, un dominio intercambiador sodio/hidrogeno que abarca el dominio transmembrana completo, y un dominio de ligamiento de nucleótidos cíclicos, localizado centralmente en la larga cola C-terminal (**Fig. 3B**, Pardo et al. 2006, Oh et al. 2007, *Aramemnon plant membrane database*, <http://crombec.botanik.uni-koeln.de/>).

La expresión heteróloga de *SISOS1* en levadura fue capaz de restaurar la halotolerancia de la cepa de levadura AXT3K defectiva en los transportadores de Na⁺ mayoritarios (**Fig. R10A**). Análogamente a lo que ocurre con el de Arabidopsis y arroz (Quintero et al. 2002; Martínez-Atienza et al. 2007), la coexpresión de SISOS1 con el complejo o AtSOS2/SOS3 o con un mutante hiperactivo de AtSOS2 independiente de AtSOS3 (SOS2T/DA308) (Guo et al. 2001, 2004), podía restaurar completamente la halotolerancia de la cepa AXT3K, permitiendo su crecimiento hasta concentraciones de 300 mM de NaCl. Dicha concentración es todavía más alta que la tolerada por la cepa AXT3K que expresaba el sistema SOS de Arabidopsis (Quintero et al. 2002), y similar a la tolerada por esa misma cepa que expresaba el sistema SOS de arroz (Martínez-Atienza et al. 2007). Estos resultados indicaban que *SISOS1* es el homólogo funcional del de Arabidopsis.

Asimismo, para comprobar de forma adicional de que *SISOS1* era el verdadero ortólogo de AtSOS1, se ha intentado ensayos de complementación funcional del fenotipo hipersensible a la sal del mutante *sos1* de Arabidopsis con el gen de tomate. Sin embargo, tales ensayos fueron infructuosos, ya que tras numerosos intentos de subclonaje en pCAMBIA1303, encontramos invariablemente la secuencia de *SISOS1* mutada, con deleciones, cambio marco de lectura etc, sobre todo después de aislar el plásmido de *Agrobacterium*. Una explicación plausible para este hecho es la dada por Martínez-Atienza et al., (2007) que encontraron una expresión residual debido al promotor viral 35S del transportador de SOS1, que parece ser deletéreo para *Agrobacterium* en presencia de Na⁺. Sin embargo, la sustitución del Na⁺ por el K⁺ en medio LB, no resolvió tampoco el problema, por lo que este ensayo fue abandonado. No obstante, el hecho de que haya una sola isoforma de *SISOS1* en el genoma de tomate,

como indicaron los experimentos de tipo *Southern* (**Fig. R3D**), y el que haya podido llevarse a cabo la caracterización funcional *in planta* de *SISOS1* por RNAi en tomate, minimiza la importancia de este ensayo en la demostración de la homología funcional de *SISOS1* con el de *Arabidopsis*.

Con el fin de evaluar la función de *SISOS1* en la planta se procedió a su silenciamiento en tomate, var. Moneymaker, mediante la estrategia de silenciamiento génico postranscripcional (PGTS) (Chuang and Meyerowitz 2000), con dos tipos de abordajes metodológicos: generación de repeticiones invertidas de un fragmento del gen blanco (construcciones hpRNAi) mediante transformación estable mediada por *Agrobacterium*, y silenciamiento génico inducido por virus (VIGS). Este último abordaje es considerado actualmente una poderosa y rápida alternativa a la hora de silenciar la expresión de un gen mediante transformación transitoria mediada por *Agrobacterium*, utilizando un vector vírico que porta un fragmento del gen blanco, en nuestro caso, el procedente de *Tobacco rattle virus* (TRV) (Liu et al. 2002). Con este procedimiento se ha llevado a cabo un gran número de ensayos utilizando como control una construcción de silenciamiento para la Mg-quelatasa que produce un fenotipo de fotoblanqueo de las hojas (Lu et al 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos han sido infructuosos para el silenciamiento de *SOS1*, aún habiéndose mostrado en cada experimento un silenciamiento sistemático de la construcción control de fotoblanqueo. Una explicación plausible a este fracaso es el bajo porcentaje de infectividad en raíces conseguido por este procedimiento (Valentine et al 2004), especialmente en este caso, en el que sería esperable que *SOS1* jugara en la raíz un importante papel en la distribución y transporte de iones a larga distancia. Además, hasta donde se conoce, no se ha descrito el silenciamiento de ningún sistema de transporte de membrana por este procedimiento, a pesar de su uso extendido, lo que puede ser indicativo de la existencia de alguna limitación metodológica o biológica para este tipo de abordaje.

Alternativamente, se ha llevado a cabo en paralelo el silenciamiento de *SISOS1* por transformación estable mediada por *Agrobacterium* mediante la utilización del sistema formado por los vectores pKannibal/pART27, que porta un fragmento con la repetición invertida del gen blanco (construcción hpRNAi), cuya expresión en la planta genera un RNA de doble cadena, necesario para inducir la maquinaria de silenciamiento (Wesley et al. 2001).

De forma similar a los resultados obtenidos previamente con el mutante *sos1* de *Arabidopsis* (Qiu et al 2002, 2003), vesículas de membrana plasmática aisladas de raíces

de una de las líneas (L1) silenciadas para el gen *SISOSI* mostraron una actividad de intercambio Na^+/H^+ reducida (**Fig. R26**), que se correlacionaba con una reducción del nivel de transcrito de *SISOSI* (**Fig. R24**) y una mayor sensibilidad a la salinidad comparada con la de las WT (**Fig. R23**), afectándose igualmente la actividad de transporte de H^+ dependiente de ATP en vesículas de plasmalema aisladas de raíces de plantas silenciadas (**Tabla R1**). Estos resultados apoyan la idea de que SOS1 o la ruta de transducción de señales SOS controla el bombeo de H^+ dentro de la zona madura de la raíz (Shabala et al 2005).

Estudios previos han mostrado que SOS1 no parecía esencial para el crecimiento y desarrollo normal de la planta, pero resultaba crítico para la tolerancia a la salinidad de *Arabidopsis* (Wu et al 1996, Shi et al 2002). En el presente trabajo mostramos que el silenciamiento de *SISOSI* tiene un fuerte efecto negativo sobre el crecimiento de la planta de tomate bajo condiciones de estrés salino, lo que extiende estas observaciones desde la planta modelo a especies de interés agronómico. Nuestros datos son consistentes con la idea de que la principal acción de SOS1 es extruir Na^+ fuera de las células de la raíz (Qiu et al. 2002; Shi et al. 2002; Shi et al. 2003, **Fig. D1**).

Las velocidades de absorción neta (NUR) de Na^+ en planta completa tanto en condiciones salinas moderadas como severas fueron tres veces más altas en plantas silenciadas en *SISOSI* que en las WT (**Tabla R2**). Según Tester y Davenport (2003), la velocidad unidireccional de Na^+ (influjo) en raíces suele ser muy alta, pero ello no se traduce normalmente en una importante acumulación de Na^+ (absorción neta), ya que ésta, usualmente 10 veces menor que el influjo unidireccional, parece implicar una velocidad sustancial de eflujo. De hecho, algunas estimaciones indican que entre el 70-90% del Na^+ absorbido en el simplasma de la raíz es extruido de nuevo al apoplasto (Tester y Davenport 2003). Por tanto, cambios pequeños en la velocidad de eflujo de Na^+ , en la que la acción de SOS1 debe ser crucial, podría tener efectos importantes en el contenido de Na^+ de la raíz. En tomate cultivado, la tolerancia a la salinidad está asociada con la exclusión de Na^+ y una velocidad de absorción de Na^+ baja (Cano et al. 1991; Taleisnik y Grunberg 1994; Guerrier 1996).

Basándose en el perfil de expresión de *AtSOS1* y la caracterización fisiológica de las plantas mutantes *sos1* de *Arabidopsis*, Shi et al. (2002) sugieren que AtSOS1 controla el transporte de Na^+ a larga distancia. Así, el mutante *sos1* de *Arabidopsis*, acumulaba menos Na^+ en la parte aérea que en la de WT, bajo condiciones de estrés salino moderado, probablemente debido a una reducción en la carga activa de Na^+ en el

xilema, mientras que lo acumulaba mucho mas bajo un estrés salino severo (100 mM NaCl). Una limitación importante de estos estudios es que el tallo tan corto de las plantas de Arabidopsis no permite una disección precisa del contenido relativo de Na^+ en el tallo respecto a la hoja, y esta separación sería crítica para evaluar el papel de de SOS1 en la carga/descarga del xilema, la translocación de Na^+ desde las raíces y la retención en el tallo.

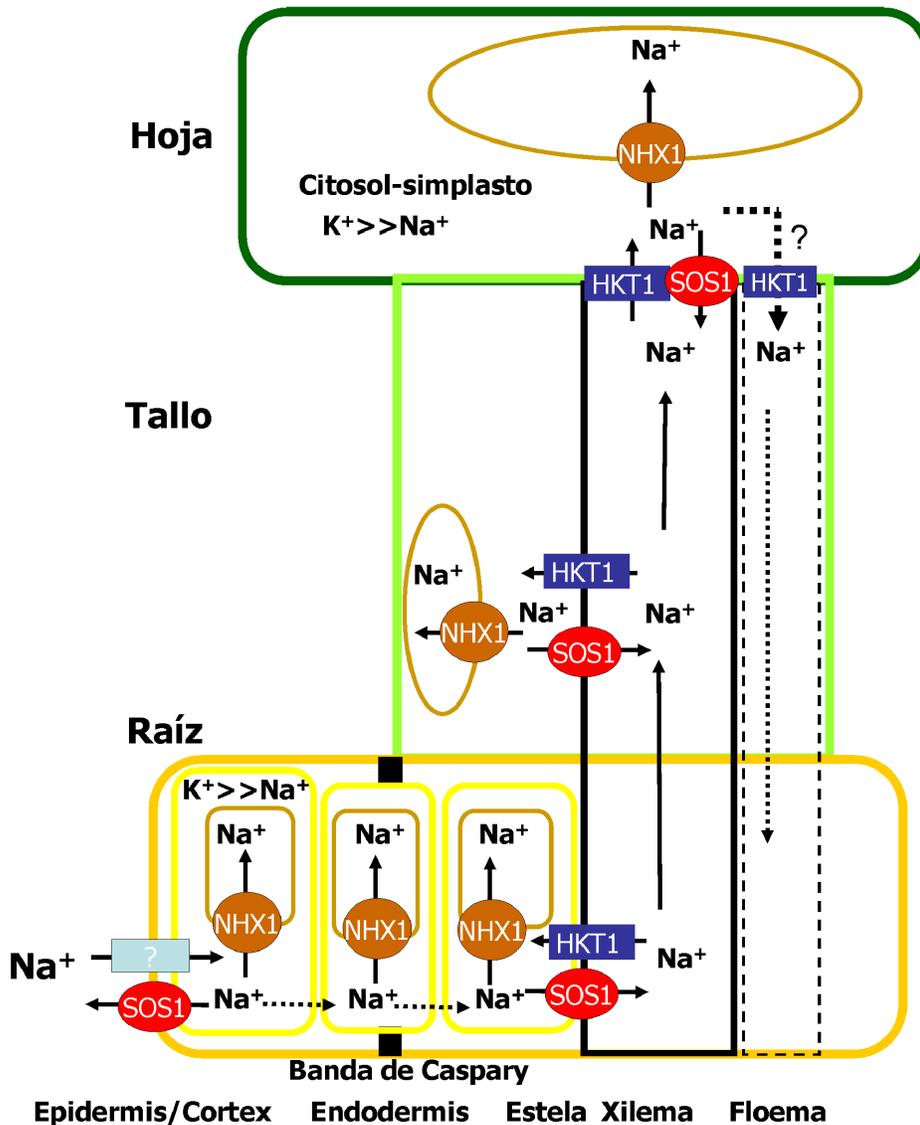


Figura D1. Flujos de Na^+ mediados por *SOS1* dentro de la planta. La acción principal de *SOS1* es extruir Na^+ fuera de la raíz y la distribución de Na^+ en los órganos de la planta. La supresión de *SOS1* causa una distribución de Na^+ con un gradiente raíz a hoja, junto con una disminución de la capacidad para acumular Na^+ en el tallo. La función de los sistemas de transporte *SOS1* y *HKT* deben de estar coordinados para conseguir la homeostasis de Na^+ y K^+ .

Las plantas de tomate silenciadas para *SISOS1* bajo condiciones salinas acumularon más Na^+ en raíces y hojas que las controles tanto bajo un estrés salino moderado como severo (**Figs. R27 y R29**). Por el contrario, los tallos de las plantas suprimidas tratadas con 25 mM de NaCl, acumularon cantidades similares de Na^+ que los controles, pero significativamente menos en tallos de plantas suprimidas sometidas a un estrés severo (100 mM de NaCl). De hecho, la media de los contenidos de Na^+ en tallos de las plantas suprimidas no cambiaron esencialmente, mientras que los de plantas control se doblaron en 100 mM, respecto al tratamiento de 25 mM de NaCl. El contenido de Na^+ en tallos de plantas control fue mayor que en raíces y en hojas, particularmente bajo un estrés moderado. Es decir, las plantas silenciadas han perdido claramente la capacidad para retener Na^+ en los tallos, en donde parece haberse establecido un gradiente acropétalo del catión, raíz a hoja.

Las raíces suelen tener una notable capacidad para controlar su propio contenido de Na^+ y muchas plantas normalmente regulan la translocación de Na^+ a la parte aérea (Tester y Davenport 2003). Como la mayoría de las glicófitas, las plantas de tomate excluyen sales de los tejidos fotosintéticos de la hoja eliminando el Na^+ desde la raíz, al tiempo que lo retienen en el tallo (Taleisnik y Grunberg 1994; Guerrier 1996). Por el contrario, las plantas silenciadas para *SISOS1* simplemente mostraron un gradiente raíz a hoja en la distribución de Na^+ junto con una reducción de la capacidad de acumular Na^+ en el tallo bajo un estrés salino severo (**Figs. R27, R28 y R29**). A 25 mM de NaCl, que es un tratamiento salino moderado que permite la comparación bajo condiciones menos astringentes, particularmente para las plantas L1, los flujos netos de Na^+ a los órganos de la planta desde el día 1 al 5 después de la imposición del estrés fueron casi 10 y 40 veces más alto en las raíces y hojas de las plantas suprimidas respecto a las WT (**Tabla R3**), mientras que la diferencia en tallos fue menor de dos veces.

Una mayor cantidad de Na^+ en las raíces debería traducirse, en principio, en una velocidad más alta de translocación a través del xilema. Efectivamente, la concentración de Na^+ en el exudado xilemático de raíces escindidas de plantas suprimidas fue mayor que la de las controles (**Tabla R4**), lo que parece ir en contra de la idea de que *SOS1* carga Na^+ en el xilema (Shi et al. 2002). En el presente trabajo, se sugiere que la absorción de Na^+ por la savia xilemática de las plantas suprimidas se debe a la carga pasiva del ión, ya que concentraciones citosólicas elevadas en las células parenquimáticas de la raíz, junto con una membrana plasmática relativamente

polarizada favorecería el movimiento de Na^+ hacia el xilema (Apse y Blumwald 2007). En otras palabras, se esperarían mayores diferencias en la concentración de Na^+ en la savia xilemática de plantas suprimidas y controles, considerando la amplia diferencia en el contenido de Na^+ de las raíces y la mayor acumulación de Na^+ en las hojas de las plantas suprimidas. Por ejemplo, el contenido de Na^+ en las raíces de plantas suprimidas después de 3 días en 25 mM de NaCl fue tres veces mayor que en las raíces control (**Fig. R29**), mientras que el pequeño incremento en la concentración de Na^+ en la savia xilemática estuvo por debajo de la significación estadística (**Tabla R4**). También es intrigante, que el transporte neto de Na^+ a la savia xilemática fuera realmente más bajo en las plantas suprimidas que en las plantas WT, esencialmente debido a una reducción drástica en el flujo de savia (**Tabla R4**), y aún la deposición de Na^+ en las hojas suprimidas fuera mayor. De nuevo, ello apunta a un papel de SOS1 en el eflujo de Na^+ desde el parenquima xilemático de las hojas que restringe la descarga de Na^+ en las mismas (**Fig. D1**), pero no debe descartarse que el flujo de savia, determinado mediante el uso raíces escindidas, no refleje las condiciones de transpiración naturales de plantas intactas (Schurr 1998).

Por otra parte, se ha demostrado que las proteínas pertenecientes a la familia HKT controlan la descarga xilemática de Na^+ en Arabidopsis, arroz y trigo (Ren et al. 2005; Davenport et al. 2007, Byrt et al. 2007), controlando, en último término, el transporte de Na^+ (a larga distancia) a la hoja. También, se ha demostrado que una actividad insuficiente de SOS1 afecta la función del canal de K^+ AKT1 (Qi y Spalding 2004) y la H^+ -ATPasa de membrana plasmática (Shabala et al 2005) en Arabidopsis. Se ha sugerido la existencia de una asociación funcional e interrelacionada entre SOS1 y HKT1;1 (Rus et al. 2004), y que las funciones de transporte de ambos sistemas están coordinados para conseguir la homeostasis de Na^+ (y de K^+) (Pardo et al. 2006, **Fig. D1**). La disfunción de uno de ellos puede alterar el transporte a larga distancia y la adecuada partición de Na^+ , resultando, por consiguiente, en un fenotipo sensible a la sal. Queda por ver si la reducción de la actividad de SOS1 en plantas suprimidas efectivamente afecta la función de proteínas HKT en el parenquima xilemático de tomate. De hecho, recientemente se ha aislado en nuestro laboratorio dos isoformas de HKT (*SIHKT1;1* y *SIHKT1;2*) de *S. lycopersicum* cv Moneymaker, cuyas secuencias aún no han sido liberadas a las bases de datos (J. Li, P. Alvarez de Morales, Z. Eljakawi, R. Olias y A. Belver, resultados no publicados). El alineamiento de las dos isoformas de tomate con otras secuencias conocidas de transportadores de tipo HKT de plantas reveló

que ambas isoformas pertenecían a la subfamilia 1, típica de Dicotiledóneas (Platten et al 2006), con AtHKT1;1 y OSHKT1;5 como proteínas tipo de esta subfamilia. Los datos obtenidos de los miembros caracterizados de esta subfamilia indican que son transportadores de Na^+ de baja afinidad que se localizan en la membrana plasmática de las células parenquimáticas que cargan al xilema, donde retiran Na^+ de la savia xilemática, previniendo su acumulación en la parte aérea (Ren et al. 2005, Rus et al 2005, Rodríguez-Navarro y Rubio 2006, Munns y Tester 2008, Huang et al 2008), por lo que podría inferirse que una o ambas isoformas de SIHKT1 podrían estar implicadas en la retirada de Na^+ del xilema y participar en coordinación con SISOS1, en el control del transporte de Na^+ a larga distancia. Si bien, esta hipótesis de trabajo está fuera de los objetivos de esta Tesis Doctoral, será objeto de estudio en nuestro laboratorio a corto y medio plazo, para analizar como afecta el silenciamiento de SISOS1 a la expresión y actividad de estos genes, así como el efecto del silenciamiento transitorio de *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* en plantas silenciadas establemente para *SISOS1* en el transporte de Na^+ a larga distancia.

Se ha observado que las plantas silenciadas para *SISOS1* son más sensibles al estrés salino que las WT. Puesto que el K^+ es un elemento esencial para muchos procesos metabólicos, era importante establecer como dicho estrés altera la homeostasis de K^+ . A este respecto, las plantas silenciadas sufrieron una gran pérdida de K^+ en raíces después de 5 días de exposición a 100 mM de NaCl. Estos resultados son consistentes con los descritos en plantas de Arabidopsis. Dichos estudios mostraron que la mutación de *AtSOS1* originó un defecto en la absorción de K^+ , que afectó el funcionamiento de raíz entera, causando una pérdida excesiva de K^+ (Wu et al. 1996; Zhu et al. 1998; Shabala et al. 2005). Qi y Spalding (2004) describieron también el daño por Na^+ de la permeabilidad de K^+ en raíces del mutante *sos1*.

D.2. SISOS2 y SISOS3

De forma análoga a como ocurría en Arabidopsis y arroz (Quintero et al 2002, Martínez Atienza et al. 2007), la coexpresión de SOS1 de tomate con el complejo AtSOS2/AtSOS3 en cepas de levadura hipersensibles a la sal incrementó fuertemente la halotolerancia de dichas cepas (**Fig. R10**). Ello constituye una evidencia de la conservación del funcionamiento de la ruta SOS también en tomate, por lo que deben existir los respectivos homólogos funcionales de las proteínas SOS2 y SOS3 en tomate.

SOS2 (CIPK24) pertenece a una subfamilia de serina proteína quinasas (*calcineurin-interacting protein kinase- CIPK*), formada por 25 miembros en Arabidopsis y 30 en arroz, mientras que SOS3 (CBL4) es uno de los 10 miembros que componen la familia de proteínas sensoras de Ca^{2+} (*calcineurin B-like protein- CBL*), tanto en Arabidopsis como en arroz (Kolukisaoglu et al 2004). Por tanto, puede ser esperable la existencia de un número similar de isoformas para ambos genes en el genoma tomate. La comprobación de que las proteínas codificadas por los genes putativos de tomate, *SISOS2* y *SISOS3*, aislados en este trabajo constituyen los verdaderos ortólogos de AtSOS y funcionan en la misma ruta de respuesta, se llevó a cabo en base a la similitud de la secuencia de dichas proteínas, ensayos de complementación funcional en levaduras y complementación genética de los respectivos mutantes *sos* de Arabidopsis.

La secuencia aminoacídica de SISOS2 exhibió la mayor homología con la de AtSOS2, de entre todas las CIPKs de Arabidopsis, (**Fig. R6**). SISOS2 tiene la estructura típica de las proteína kinasas de tipo CIPK, y particularmente la que se ha descrito para AtSOS2: un dominio catalítico en la región N-terminal, y el motivo FISL o NAF en la región reguladora del C-terminal, que sirve como un dominio autoinhibitorio necesario y suficiente para su interacción con SOS3, de manera que dicha interacción libera el dominio autoinhibitorio, permitiendo el acceso de la proteína sustrato, al dominio quinasa, en este caso SOS1 y por tanto su activación por fosforilación (**Fig. A11**, Guo et al. 2001, Gong et al 2004, Sánchez-Barrena et al 2005, 2007). Como en AtSOS2, también contiene un sitio de autofosforilación en la Ser228, que se ha revelado como esencial en la tolerancia de Arabidopsis a la salinidad (Fujii y Zhu 2009). Asimismo, se predice la presencia del dominio PPI o dominio de interacción con fosfatasa. Así, se ha descrito que la fosfatasa ABI2 (Abscisic acid-Insensitive 2) es una proteína que interacciona con SOS2, de manera que su ligamiento previene el de SOS3 a SOS2 y la subsiguiente activación del complejo quinasa (Ohta et al. 2003). El dominio PPI de SOS2 es bloqueado por SOS3, lo que asegura que las dos actividades opuestas, fosforilación y defosforilación, no ocurran simultáneamente. (Sánchez-Barrena et al 2007).

La secuencia aminoacídica de SISOS3 también mostró, de entre todas las CBLs de Arabidopsis, la mayor homología con la de AtSOS3, conteniendo los mismos motivos esenciales para ejercer su acción sensora de Ca^{2+} : dos pares de motivos *EF-hands* con 4 sitios putativos de ligamiento del Ca^{2+} y sendos motivos de miristoilación y

palmitoilación en su N-terminal, esenciales para el anclaje a la membrana plasmática del complejo SOS2/SOS3 (**Figs. R9, A12**, Ishitani et al. 2000; Quintero et al. 2002). La descripción de la estructura cristalina de AtSOS3 por difracción de Rayos-X (Sanchez-Barrena et al 2005) y del complejo AtSOS3/AtSOS2 (Sanchez-Barrena et al 2007), ha permitido postular su mecanismo sensor del Ca^{2+} . De acuerdo con ello, la unión de Ca^{2+} promueve la dimerización de SOS3, causando un cambio conformacional que incrementa su carácter hidrofóbico permitiendo su unión con el motivo FISL de SOS2. Ello unido a la miristoilación (y palmitoilación) de su extremo N-terminal dirige el complejo a las inmediaciones de SOS1 en la membrana plasmática, donde es activada por fosforilación (Quintero et al. 2002).

Utilizando la misma cepa de levadura AXT3K que lleva insertada en su genoma una copia de *AtSOS1* (Guo et al 2004), hemos podido comprobar que solo la coexpresión conjunta de *SISOS2* y *SISOS3* es capaz de incrementar la tolerancia a la sal de dicha cepa, mientras que no hubo ningún efecto en ausencia de *SISOS3* (**Fig. R11**), indicando que el complejo quinasa de tomate es capaz de activar por fosforilación a AtSOS1. De forma similar, la inserción de una copia de *SISOS1* en el genoma de la cepa de levadura AXT3K, nos ha permitido la reconstitución de todo el sistema SISOS (**Fig. R12**), de forma análoga a como se ha hecho con el de Arabidopsis (Quintero et al. 2002). La cepa AXT3K con *SISOS1* insertado soporta concentraciones de NaCl mas bajas que la misma cepa cuando expresa SISOS1 mediada por un vector plasmídico (**Fig. R10**). No obstante, la coexpresión de *SISOS2* y *SISOS3* de nuevo incrementó la tolerancia de la primera demostrando que el complejo SISOS2/SISOS3 de tomate es capaz de activar a SISOS1 en levadura. Todos estos resultados son indicativos de que los genes que componen el sistema SISOS de tomate son los ortólogos de AtSOS y funcionan en la misma ruta de respuesta.

Los genes AtSOS2 y AtSOS3 complementaron funcionalmente las líneas respectivas mutantes *sos* (salt-overly sensitive) de Arabidopsis (Liu y Zhu 1998, Shi et al. 2000, Liu, et al. 2000). De forma similar, se diseñaron experimentos para comprobar de forma adicional, que los genes *SISOS2* y *SISOS3* eran capaces, cada uno de ellos, de complementar funcionalmente los respectivos fenotipos hipersensibles a la sal de estos mutantes *sos* de Arabidopsis.

El promotor de SISOS2 posee elementos reguladores en *cis* implicados en la regulación de la expresión específica de tejido (p.e., endospermo, embrión), luz, hormonas (giberelinas, ABA, etileno y auxinas) y estreses bióticos y abióticos, algunos

de ellos ya puestos de manifiesto en relación a la implicación de SISOS2 en el fotocontrol de la germinación de semillas de tomate (Auge et al. 2009). Todo ello sugiere la participación de SISOS2 en una compleja red de señalización en crecimiento y desarrollo de la planta que abarca desde la germinación hasta el último estadio del desarrollo ontogénico. Recientemente, SISOS2 se ha localizado en el cromosoma 12 de dos poblaciones de líneas recombinantes (RILs -*Recombinant Inbred Line*-), una derivada de *S. pimpinellifolium*, y otra de *S. cheesmanii*, parece estar asociado a QTLs relacionados con el desarrollo de la hoja y la floración (Villalta et al 2008).

Dada la alta homología de AtCBL1, AtCBL5, AtCBL9 y AtCBL8 con SISOS3 y que también contengan motivos conservados de miristoilación, así como el hecho de que AtCBL1 y AtCBL9 también se localizan en la membrana plasmática (Xu et al. 2006; Li et al. 2006; Cheong et al. 2003), cabría la posibilidad de que el gen de tomate no fuera el homólogo funcional de AtCBL4/AtSOS3.

VIII. Conclusiones

1. Se han aislado los genes que codifican a los miembros de la ruta SOS de tomate: *SISOS1*, *SISOS2* y *SISOS3*. La reconstitución del sistema de SISOS en levadura y la complementación funcional de *SISOS2* y *SISOS3* en los respectivos mutantes *sos* de *Arabidopsis* demuestran que cada uno de los genes de tomate son los ortólogos funcionales de *AtSOS*.
2. El silenciamiento de la expresión del antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática, *SISOS1*, genera un fenotipo hipersensible a la sal en tomate, deficiente en K^+ , y confirma su papel en el mantenimiento de la homeostasis iónica en tomate, como planta exclusora de Na^+ con capacidad para tolerar concentraciones moderadas de sal. El papel principal de SISOS1 es evitar la entrada masiva de Na^+ por las raíces a través de su actividad extractora de Na^+ al medio. Asimismo, se ha puesto de manifiesto que la función de *SISOS1* es fundamental en la distribución de Na^+ en los órganos de la planta y en la capacidad del tallo de retener Na^+ , evitando su entrada masiva a los tejidos fotosintéticos.

IX. Bibliografía

Abel GH (1969) Inheritance of the capacity for chloride exclusion by soybean. Crop Sci 9: 697-699.

Ahlfors R, Lang S, Overmyer K, Jaspers P, Brosche M, Tauriainen A, Kollist H, Tuominen H, Belles-Boix E, Piippo M, Inze D, Palva ET, Kangasjarvi 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, *Plant Cell* 16 1925–1937.

Albacete A, Martínez-Andújar C, Ghanem ME, Acosta M, Sánchez-Bravo J, Asins MJ, Cuartero J, Lutts S, Dodd I C Pérez-Alfocea F (2009) Rootstock-mediated changes in xylem ionic and hormonal status are correlated with delayed leaf senescence and increased leaf area and crop productivity in salinised tomato. *Plant, Cell Environment*, doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01973.x .

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 22: 3389-3402.

Amaya I, Botella MA, de la Calle M, Medina MI, Heredia A, Bressan RA, Hasegawa PM, Quesada MA Y Valpuesta (1999) Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.* 457: 80-84.

Antosiewicz, DM and Hennig J (2004) Overexpression of LCT1 in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environ. Pollut.* 129, 237–245.

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.

Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E (2003) Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant J* 36: 229-239

Apse MP, Blumwald E (2007) Sodium transport in plants. *FEBS Lett* 581: 2247-2254.

Asins MJ (2002) Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 121: 281-291.

Ashraf M, Athar HR, Harris PJC, Kwon TR (2008) Some Prospective Strategies for Improving Crop Salt Tolerance. *Adv Agron* 97: 45-110.

- Ashraf, M (2009)** Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol Adv* 27: 84–93.
- Azaizeh H, Steudle E (1991)** Effects of salinity on water transport of excised maize (*zea mays* L) Roots. *Plant*. 97: 1136-1145.
- Baulcombe DC (2002)** RNA silencing. *Curr Biol* 12: R82-R84
- Ballesteros E, Donaire JP y Belver A (1996)**. Effects of salt stress on H^+ -ATPase and H^+ -PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Physiol Planta* 97: 259-268.
- Ballesteros E, Blumwald E, Donaire JP, Belver A (1997)** Na^+/H^+ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol Plant* 99: 328-334.
- Ballesteros E, Donaire JP, Belver A (1998)** Effects of salt stress on H^+ -ATPase activities of plasma membrane-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Plant Sci* 134: 181-190.
- Bañuelos MA, Haro R, Fraile-Escanciano, A, Rodríguez-Navarro A (2008)** Effects of Polylinker uATGs on the Function of Grass HKT1 Transporters Expressed in Yeast Cells. *Plant Cell Physiol*. 49: 1128–1132.
- Barragán V (2007)** Implicación de los intercambiadores catión/protón NHX vacuolares de *Arabidopsis thaliana* en la homeostasis iónica celular. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla
- Barrero-Gil J, Rodríguez-Navarro A, Benito B (2007)**. Cloning of the PpNHAD1 transporter of *Physcomitrella patens*, a chloroplast transporter highly conserved in photosynthetic eukaryotic organisms. *J ExpBot*. 58, 2839-2849
- Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S Q, Schumaker K, Grillo S, Zhu J.-K 2007** SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H^+ -ATPase and upregulating its transport activity. *Mol Cell Biol* 27:7781–7790.
- Belver A, Travis RL (1990)** Effect of NaCl and mannitol on plasma membrane proteins in corn roots. *Protoplasma* 155: 76-84.
- Belles-Boix E, Babiychuk E, Van Montagu M, Inze D, Kushnir S, (2000)** CEO1, a new protein from *Arabidopsis thaliana*, protects yeast against oxidative damage. *FEBS Lett*. 482 19–24.
- Benito B, Garcideblas B, Rodríguez-Navarro A (2002)** Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *An Microbiol (Rio J)* 148: 933–941.

- Benito B, Rodríguez-Navarro A (2003)** Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 36: 382–389
- Berthomieu P, Conejero G, Nublat A, Brackenbury WJ, Lambert C, Savio C, Uozumi N, Oiki S, Yamada k, Cellier F, Gosti F, Simonneau T, Essah PA, Tester M, Vey A.a, Sentenac H.y Casse F.(2003)** Funcional analysis of *AtHKT* in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22: 2004-2014.
- Blumwald E, Rea RA, Poole RJ (1987)** Preparation of tonoplast vesicles: application to H⁺-coupled secondary transport in plant vacuoles. *Methods Enzymol* 148: 115-123.
- Blumwald.E; Aharon.G.S y Apse.MP (2000).** Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta* 1465: 140-151.
- Bohnert HJ, Jensen RG (1996)** Metabolic engineering of increased salt tolerance- The next step. *Aust J Plant Physiol* 23: 661-667.
- Botella MA, Rosado A, Bressan RA, Hasegawa (2005)** Plant adaptive to salinity stress. In *Plant Abiotic Stress* MA Jenks and PM Hasegawa (eds). pp. 37-70. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.
- Brett CL, Donowitz M., Rao R. (2005)** Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physio* 288: 223-239.
- Brigneti G, Martin-Hernandez A, Jin H, Chen J, Baulcombe D, Baker B, (2004)** Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J* 39:264–72.
- Brown DJ, Dupont FMC (1989)** Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from root of barley (*Hordeum vulgare* L.). Effect of salt. *Plant Physiol* 90: 955-961.
- Brunelli JP and Pall ML (1993)** A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DNA sequences. *Yeast* 9: 1299-1308.
- Buckhout TJ, Bell PF, Luster OG, Chaney RL (1988)** Ion stress induced redox activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is localized on the plasma membrane. *Plant Physiol* 90: 151-156.
- Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP (2004)** Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J* 39:734–46.

- Byrt CS, Platten JD, Spielmeier W, James RA, Lagudah E.S, Dennis ES, Tester M, Munns R (2007)** HKT1;5-like cation transporters linked to Na⁺ exclusion loci in wheat, *Nax2* and *Kna1*. *Plant Physiol* 143: 1918-1928.
- Byrt CS, Munns R (2008)** Living with salinity. *New Phytologist* 179: 901–903
- Cano EA, Perez-Alfocea F, Moreno V, Bolarin MC (1996)** Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures. *Plant Cell Reports* 15: 791-794.
- Cheeseman JM (1988)** Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol* 87: 547-550.
- Cheng NH, Pittman JK, Zhu JK, Hirschi KD (2004)** The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J Biol Chem* 279: 2922-2926
- Cheong YH, Kim K-N, Pandey GK, Gupta R, Grant JJ, Luan S (2003)** CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 15: 1833–1845.
- Chinnusamy V Jagendorf, A, Zhu, JK (2005)** Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci* 45, 437–448
- Chuang CF, Meyerowitz EM (2000).** Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4985-4990.
- Chung J-S, Zhu J-K, Bressan R A, Hasegawa PM Shi, H (2008)** Reactive oxygen species mediate Na⁺-induced SOS1 mRNA stability in Arabidopsis. *Plant J* 53: 554–565.
- Church GM, Gilbert W (1984)** Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995.
- Clough SJ, Bent AF (1998)** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16:735-43.
- Colmenero-Flores J M, Martinez G, Gamba G, Vazquez N, Iglesias D.J, Brumos J, Talon M (2007)** Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant J* 50, 278-292.
- Cramer GR, Läuchli A, Polito VS (1985) Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt-stress. *Plant Physiol* 79: 207-211.

- Cramer GR, Epstein E, Lauchli A (1988)** Kinetics of root elongation of maize in response to short-term exposure to NaCl and elevated calcium concentration. *J Exp Bot* 39: 1513-1522.
- Cramer GR, Bowman DC (1991)** Short-term leaf elongation kinetics of maize in response to salinity are independent of the root. *Plant Physiol* 95: 965-967.
- Cuartero J, Yeo AR, Flowers TJ (1992)** Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *New Phytol* 121: 63-69.
- Cuartero J, Fernández-Muñoz R (1999)** Tomato and salinity. *Sci Hort* 78: 83-125
- Cuartero J, Bolarín MC, Asíns MJ, Moreno V (2006)** Increasing salt tolerance in the tomato *J. Exp. Bot.*, 57: 1045 - 1058.
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC (2000)** An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101,543-553.
- Davenport R, James R, Zakrisson A, Tester M, Munns R (2005)** Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiol.* 137, 807-818.
- Davenport RJ, Muñoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A, Tester M (2007)** The Na⁺ transporter AtHKT1 controls xylem retrieval of Na⁺ in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 30: 497–507.
- Davies WJ, Zhang J (1991)** Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 55-76.
- Davuluri GR, Tuinen A, Mustilli AC, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell DA, King SR, Palys J, Uhlig J, Pennings HMJ, Bowler C (2004)** Manipulation of DET1 expression in tomato results in photomorphogenic phenotypes caused by post-transcriptional gene silencing. *Plant J* 40: 344–354.
- Ding L, Zhu, J.K (1997)** Reduced sodium uptake in the salt-hypersensitive *sos1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 113: 795-799.
- De Boer AH, Volkov V (2003)** Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem *Plant Cell and Environment* 26: 87-101.
- Delauney AJ, Verma DPS (1993)** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4: 215-223.
- Demidchik V, Tester M (2002)** Sodium fluxes through non selective cation in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 128, 379-387.
- Durand M, Lacan D (1994)** *Physiol Plant* 91: 65-71.

- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991)** a simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Res* 19: 1349.
- Ellul P, García-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig LA, Moreno V (2003)** The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L.Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theor Appl Genet* 106: 231-238
- Essah P, Davenport R, Tester M (2003)**. Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 307-318.
- Estañ MT, Martínez-Rodríguez MM, Pérez-Alfocea F, Flowers TJ, Bolarín MC (2005)** Grafting raises the saltolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *J Exp Bot* 56: 703-712.
- Fagard M, Vaucheret H (2000)** Transgene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:167–194
- FAO (2008)** *FAO Land and Plant Nutrition Management Service*. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Farazi TA, Waksman G, Gordon JI (2001)** The Biology and Enzymology of Protein N-Myristoylation. *J. Biol. Chem.* 276: 39501-39504
- Fire A, Xu S-Q, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
- Flowers T J (2004)** Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* 55: 307-319
- Flowers TJ, Colmer TD (2008)** Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179: 945–963.
- Foolad MR (2004)** Recent Advances in Genetics of Salt Tolerance in Tomato. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 76: 101–119, 2004. a
- Foolad MR (2007)** Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *Intern J Plant Genom*, doi:10.1155/2007/64358
- Ghanem ME, Albacete A, Martínez-Andujar C, Acosta M, Romero-Aranda R, Dodd IC, Lutts S, Pérez-Alfocea F (2008)** Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *J Experim Bot*, doi:10.1093/jxb/ern153.

- Gao Z, Sagi M, Lips SH (1998)** Carbohydrate metabolism in leaves and assimilation partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity. *Plant Sci* 135: 149-159
- García A, Rizzo RJ, Bartos, SL, Senadhira D, Flowers TJ, Yeo AR (1997)** Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium:potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant Cell Environ* 20: 1167-1174
- Garciadeblás B, Senn ME, Bañuelos MA, Rodríguez-Navarro A (2003)** Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J* 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: 479-90.
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grifasi P, Alpier SL, Fink GR (1999)** The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1480-1485.
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper S L, Fink GR (2001)** Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺ pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11444–11449.
- Gietz RD, Woods RA (2002)** Transformation of yeast by the LIAC/SS carrier DNA/PEG method. *Meth Enzim* 350: 87-96.
- Gilroy S, Trewavas AJ (2001).** Signal processing and transduction in plant cells: The end of the beginning? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 307–314
- Gleave AP (1992)** A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* 20: 1203-1207.
- Godge M, Purkayastha A, Dasgupta I, Kumar P (2007)** Virus induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Rep* 27:209–19.
- Gogstad OG, Krutnsnes MG (1982)** Measurements of protein in cell suspension using the coomassie brilliant blue binding assay. *Anal Biochem* 126: 355-359
- Gong DM, Guo Y, Schumaker KS, Zhu J K (2004)** The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in arabidopsis. *Plant Physiol.* 134:919–926.

- Gorham J, Wyn Jones RG, Bristol A (1990)** Partial characterization of the traits for enhanced K^+ - Na^+ discrimination the D genome of wheat. *Planta* 180: 590-597
- Greenway H, Munns R (1980)** Mechanisms of salt-tolerance in non-halophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 149-190.
- Gogstad OG, Krutnsnes MG (1982)** Measurements of protein in cell suspension using the coomassie brilliant blue binding assay. *Anal Biochem* 126: 355-359
- Guerrier G (1996)** Fluxes of Na^+ , K^+ and Cl^- , and osmotic adjustment in *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* during short- and long-term exposures to NaCl. *Physiol Plant* 97: 583-591.
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (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 CP, Gong D, Halfter U, Zhu JK (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 QS, Quintero FJ, Pardo JM, Ohta M, Zhang C, Schumaker KS, Zhu JK (2004)** Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement of its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 435-449.
- Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2000)** The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 3735-37.
- Hall D, Evans AR, Newbury HJ, Pritchard J (2006)** Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 57, 1201-1210.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999)** A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952
- Hannon GJ (2002)** RNA interference. *Nature* 418:244–251
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998)** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ*. 21: 535-553
- Haro R, Bañuelos MA, Senn ME, Barrero-Gil J, Rodriguez-Navarro A (2005)** HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol*. 139:1495-506.

- Hartung W, Sauter A, Hose E (2002).** Abscisic acid in the xylem: where does it comes from, where does it goes to? *Journal of Experimental Botany*, 53: 27-32.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000)** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:463–99
- Hepler PK (2005)** Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell* 17, 2142–2155.
- Higinbotham N (1973)** Electropotentials of plants cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 24, 25-46
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983)** Binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-180
- Horie T, J Schroeder (2000)** Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol.* 136, 2457-2462
- Horie T, Schroeder JL (2004)** Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol* 136: 2457-62.
- Horie T, Yoshida K, Nakayama H, Yamada K, Oiki S, Shinmyo A (2001)** Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J* 27, 129-138.
- Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, Leung HY, Miyao A, Hirochika H, An G, Schroeder JI (2007)** Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO J* 26, 3003-3014
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC (2003)** The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. *Plant Physiol* 132, 666-680
- Huang SB, Spielmeyer W, Lagudah ES, James RA, Platten JD, Dennis ES, Munns R (2006)** A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiol* 142, 1718-1727.
- Huang S, Spielmeyer W, Lagudah ES, Munns, R (2008)** Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley and rice, key determinants of Na⁺ transport and salt tolerance. *J Exp Bot* 59: 927-937.
- Hurkman WJ (1992)** Effect of salt stress on plant gene expression: a review. *Plant Soil* 146: 145-151.

Hutvágner G, Zamore PD (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12:225–232

Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ (1996) Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J* 9: 537-848.

Ishitani M, Liu J, Halfter U, Ki, CS, Shi W, Zhu JK (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 12: 1667-1678.

James RA, Davenport RJ, Munns R (2006) Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in Durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. *Plant Physiology* 142, 1537-1547.

Jeschke WD (1984) K⁺-Na⁺ exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. In *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement*. Staples RC, Toenniessen GH (ed), pp. 37-66. Wiley-Interscience. New York.

Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Kim K, Agarwal M, Fu X, Huang A, Zhu JK (2006) The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:18816–18821.

Kerkeb B (2000) Mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia a la salinidad en especies cultivada y silvestre de tomate: papel de los enzimas translocadores de iones de plasmalema y tonoplasto. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 274 pp.

Kim BG, Waadt R, Cheong YH, Pandey GK, Dominguez-Solis JR, Schultke S, Lee SC, Kudla J, Luan S (2007) The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis* *Plant J.* 52 473–484.

Kishor PBK, Hong Z, Mao G-H, Hu C-AA, Verma DPS (1995) Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* 108: 1387-1394.

Knight H Trewavas AJ, Knight MR (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12: 1067-1078.

Koch KE (1996) Carbohydrate-modulated gene expression plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509-540.

Kolukisaoglu U, Weinl, S, Blazevic D, Batistic O, Kulda J (2004) Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 134, 43–58.

- Koncz C, Schell J (1986)**. The promoter of the TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204: 383–396.
- 9066.
- Kramer PJ (1988)** Changing concepts regarding plant water relations. *Plant Cell Environm* 11:565-568
- Läuchli A, Epstein E (1990)** Plant responses to saline and sodic conditions. *In* Agricultural Salinity Assessment and Management. Tanji KK (ed), pp. 113-137. American Society of Civil Engineers, New York.
- Lazof D, Läuchli A (1991)** The nutritional status of the apical meristem of *Lactuca sativa* as affected by NaCl salinization: an electron-probe microanalytic study. *Planta* 184: 334-342.
- Leidi EO, Barragán V, Cubero B, Quintero FJ & Pardo JM (2005)** Function of endosomal NHX antiporters on plant K nutrition. Society of Experimental Biology Annual Main Meeting, Comparative Biochemistry and Physiology – Part A 141, S342.
- Leng Q, Mercier RW, Hua BG, Fromm H, Berkowitz GA (2002)** Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol* 128, 400–410.
- Li X, Borsics T, Harrington HM, Christopher D A (2005)** Arabidopsis ArCNGC10 rescues potassium channel mutants of *E. coli*, yeast and Arabidopsis and is regulated by calcium/calmodulin and cyclic GMP in *E. coli*. *Funct. Plant Biol.* 32, 643–653.
- Li L, Kim B G, Cheong Y H, Pandey G K, Luan S (2006)** A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 12625-12630.
- Lin H, Yang Y, Quan R, Mendoza I, Wu Y, Du W Zhao S, Schumaker KS, Pardo JM 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* doi/10.1105/tpc.109.066217 (in press).
- Liu J, Zhu JK (1997)** Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 114: 591-596.
- Liu J, Zhu JK (1998)** A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280: 1943-1945.

- Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK (2000)** The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 3730-3734.
- Lunde C, Drew DP, Jacobs AK, Tester M (2007)** Exclusion of Na⁺ via Sodium ATPase (PpENA1) Ensures Normal Growth of *Physcomitrella patens* under Moderate Salt Stress. *Plant Physiol* August; 144: 1786–1796.
- Lynch J, Läuchli A (1988)** Salinity affects intracellular Ca²⁺ in corn root protoplasts. *Plant Physiol* 87: 351-356.
- Lynch J, Polito VS, Läuchli A (1989)** Salinity stress increases cytoplasmic Ca²⁺ activity in maize root protoplasts. *Plant Physiol* 90: 1271-1274
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC (2003)** Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30:296–303.
- Luan S (2009)** The CBL–CIPK network in plant calcium signalling. *T Plant Sci* 14:37-42.
- Maathuis, FJ.M, Amtmann, A (1999)**. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *An Bot*, 84: 123-133.
- Maathuis FJM (2006)** The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *J Exp Bot* 57:1137-1147
- Marschner H (1995)** *The Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.
- Mahajan S, Sopoy SK, Tuteja N (2006)** Cloning and characterization of CBL-CIPK signaling components from a legume (*Pisum sativum*). *FEBS J* 273, 907–925.
- Mahajan S, Girdhar KP, Tuteja N (2008)** Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Arch Biochem Biophys* 471: 146–158.
- Malagoli P, Britto DT, Schulze LM, Kronzucker HJ (2008)**. Futile Na⁺ cycling at the root plasma membrane in rice (*Oryza sativa* L.): kinetics, energetics, and relationship to salinity tolerance. *J Exp Bot* 59(15): 4109 – 4117.
- Martinez-Atienza J, Jiang X, Garciasdeblas B, Mendoza I, Zhu JK, Pardo JM, Quintero FJ (2007)** Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiol* 143: 1001-1012.
- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML (2001)** Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol* 126: 1646–1667

- Maser P, Eckelman B, Vaidyanathan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M., Yamagami M, Yamaguchi k, Nishimura M, Uzumi N, Robertson W, Sussaman M.R y Schroeder J.I (2002)** Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1 . FEBS Lett. 531: 157-161.
- Meinzel T, Peynot P, Giglion C (2005)** Processed N-termini of mature proteins in higher Eukaryotes and their major contribution to dynamic proteomics. Biochimie 87: 701-712
- Mennen H, Jacoby B, Marschner H (1990)** Is sodium proton antiport ubiquitous in plant? J Plant Physiol 137: 180-183.
- Moller IS, Tester M (2007)** Salinity tolerance in Arabidopsis: a good model or cereals? T Plant Sci 12: 534–540.
- Mumberg D, Muller R, Funk M (1995).** Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene 156: 119-122.
- Munns R (1993).** Physiological processes limiting plant-growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. Plant, Cell Environm 16: 15-24.
- Munns R (2002)** Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ.25:239–50
- Munns R (2005).** Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytol 167:645–63
- Munns R, Tester M (2008)** Mechanisms of Salinity Tolerance Annu Rev Plant Biol 2008. 59:651–81.
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:235-240.
- Nagae M, Nozawa A, Koizumi N, Sano H, Hashimoto H, Sato M, Shimizu T (2003)** The crystal structure of the novel calcium- binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 278: 42240–42246
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Kakubari Y, Yamagushi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999)** Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant J 18: 185-193
- Navarro JM, Garrido C, Martinez V, Carvajal M (2003)** Water relations and xylem transport of nutrients in pepper plants grown under two different salts stress regimes. Plant Growth Reg 41: 237-245.

- Neumann PM, Van Volkenburgh E, Cleland RE (1988)** Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiol* 88: 233-237.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005)**. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 56:2907–2914.
- Niu X, Bressau RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995)** Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol* 109: 735-742.
- Oh DH, Gong Q, Ulanov A, Zhang Q, Li Y, Ma W, Yun DJ, Bressan R.A & Bohnert HJ (2007)** Sodium stress in the halophyte *Thellungiella halophyla* and transcriptional changes in a thsos1-RNA interference line. *J Integr Plant Biol* 49: 1484-1496.
- Ortiz A, Martínez V, Cerdá A (1994)** Effects of osmotic shock and calcium on growth and solute composition of *Phaseolus vulgaris* plants. *Physiol Plant* 91: 468-476.
- Ohta M, Guo Y, Halfter U, Zhu JK (2003)**. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:11771-11776.
- Palauqui JC, Elmayer T, Pollien JM, Vaucheret H (1997)** Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to nonsilenced scions. *EMBO J* 16:4738–4745
- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ (2006)** Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot* 57, 1181-1199.
- Pearson WR, Lipman DJ (1988)** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-2448.
- Pérez-Alfocea F, Estañ MT, Cano M, Bolarin MC (1993)** Reponse of tomato cultures to salinity. *Plant Soil* 250: 203-211.
- Pérez-Alfocea F, Santa Cruz A, Guerrier G, Bolarin MC (1994)** NaCl stress induced organic solute changes on leaves and calli of *Lycopersicon esculentum*, *L. pennellii* and their interspecific hybrid. *J Plant Physiol* 143: 106-111
- Petrusa LM, Winicov I (1997)** Proline status in salt-tolerance and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiol Biochem* 35: 303-310.
- Pilon-Smith EAH, Ebskamp MJM, Paul ML, Jeuken MJW, Weisbeek PJ, Smeekens SCM (1995)** Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107: 125-130.

- Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin HX, Luan S, Maser P, Pantoja O, Rodriguez-Navarro A, Schachtman DP, Schroeder JI, Sentenac H, Uozumi N, Very AA, Zhu JK, Dennis ES, Tester M (2006)** Nomenclature for HKT genes, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci* 11:372–74.
- Qi Z, Spalding EP (2004)** Protection of plasma membrane K^+ transport by the Salt Overly Sensitive1 Na^+ - H^+ antiporter during salinity stress. *Plant Physiol* 136: 2548-2555.
- Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK (2002)** Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8436-8441.
- Qiu QS, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Zhu JK, Schumaker KS (2003)** Na^+/H^+ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 1041-1052.
- Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK (2004)** Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J Biol Chem* 279: 207-215
- Quan R., Lin H, Mendoza I, Zhang Y, Cao W, Yang Y, Shang M, Chen S, Pardo JM, 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
- Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM (2000)** Functional conservation between yeast and plant endosomal Na^+/H^+ antiporters. *FEBS Lett* 471: 224-228
- Quintero FJ, Ohta M, Shi HZ, Zhu JK, Pardo JM (2002)** Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na^+ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9061-9066.
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai, XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan, Lin HX Lin (2005)** A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Gen* 37: 1141-1146.
- Rentsch D, Laloi M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot, S Frommer, WBV (1995)** NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 370: 264-268.
- Rengel Z (1992)** The role of calcium in salt-toxicity. *Plant Cell Environm* 15: 625-632.

Roberts CS, Rajagopal S, Smith LA, Nguyen TA, Yang W, Nugroho S, Ravi KS, Cao M-L, Vijayachandra, Patell V, Harcourt RL, Dransfield L, Desamero N, Slamet I, Keese P, Kilian A, Jefferson RA (2003) A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulations and efficient transformation of plants by both *Agrobacterium* and direct DNA uptake methods. pCAMBIA Vector release manual version 3.05. pp 1-6.

Rodríguez-Rosales PM, Kerkeb L, Bueno P, Donaire JP (1999) Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill) Calli. Plant Sci 143: 143-150.

Rodríguez-Rosales MP, Jiang XJ, Gálvez FJ, Aranda MN, Cubero B, Venema K (2008) Overexpression of the Tomato K⁺/H⁺ Antiporter LeNHX2 Confers Salt Tolerance by Improving Potassium Compartmentalization. New Phytol 179: 366-377.

Rodríguez-Rosales MP, Galvez F, Huertas R, Aranda MN, Baghour M, Cagnac O, Venema K (2009) Plant NHX cation/proton antiporters. Plant Signaling & Behavior 4: 4 1-13.

Rodriguez-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.

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

Rubio F, Gassmann W y Schroeder JI (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science 270:1660-1663.

Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto, T K, Koiwa H, Zhu J K, Bressan R A, Hasegawa P M (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. PNAS 98: 14150-14155.

Rus A, Lee B H Muñoz-Mayor A, Sharkhuu, A, Miura K, Zhu, J.K, Bressan R A, Hasegawa P M (2004) AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in plants. Plant Physiol 136: 2500-2511.

- Rus AM, Bressan RA, Hasegawa PM (2005)** Unraveling salt tolerance in crops. *Nat Gen* 37: 1029- 1030.
- Rus A, Baxter I, Muthukumar B, Gustin J, Lahner B, Yakubova E Salt DE (2006)** Natural variants of AtHKT1 enhance Na⁺ accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 2: 1964-1973.
- Rush DW, Epstein E (1981)** Comparative studies on the sodium, potassium and chloride relations of a wild halophytic and domestic salt sensitive tomato species. *Plant Physiol* 68: 1308-1313
- Salvi S, Tuberosa R (2007)** Cloning QTLs In Plants. In *Genomics-Assisted Crop Improvement: Vol. 1: Genomics Approaches and Platforms*, R.K. Varshney and R. Tuberosa (eds.),207–225. Springer
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Zhu JK, Albert A (2005)** The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *J Mol Biol* 345, 1253-1264
- Sanchez-Barrena MJ, Fujii H, Angulo I, Martínez-Ripoll M, Zhu JK, Albert A. (2007)** The structure of the c-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Mol Cell* 26:427-435.
- Saneoka H, Nagaseka C, Hahn DT, Yang WJ, Premachanda GS, Joly RJ, Rhodes D (1995)** Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and containing maize lines. *Plant Physiol* 107: 631-638.
- Schachtman DP, Schroeder JI (1994)** Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370: 655-658.
- Senthil-Kumar M, Gowda HVR, Hema R, Mysore KS, Udayakumar M (2008)** Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 165:1404-1421
- Senthil-Kumar M, Anand A, Uppalapati SR, Mysore KS (2008)** Virus-induced gene silencing and its applications. *CAB Rev: Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour* 3:18.
- Senthil-Kumar M, Hema R, Anand A, Kang L, Udayakumar M, Mysore KS (2007)** A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytol* 176:782–91.

- Serrano R, Gaxiola R (1994)** Microbial models and salt-stress tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13: 121-138.
- Serrano R (1996)** Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 165: 1-52.
- Serrano R, Mulet JM, Rios G, Marquez JA, de Larrinoa IF, Leube MP, Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Proft M, Ros R, Montesinos C (1999)** A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot* 50: 1023-1036.
- Serrano R, Rodriguez-Navarro A (2001)** Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Op.Cell Biol.*, 13: 399-404.
- Shahin EA (1985)** Totipotency of tomato protoplasts. *Theor Appl Gen.* 69:235-240.
- Shabala L, Cuin TA, Newman IA y Shabala S (2005)** Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis* sos mutants. *Planta* 4: 1-10.
- Shabala S, Demidchik V, Shabala L, Cuin TA, Smith SJ, Miller AJ, Davies JM, Newman IA (2006)** Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl-induced K1 loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K^{+} -permeable channels. *Plant Physiol* 141: 1653–1665
- Shabala S, Cuin TA (2007)** Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Planta* 133:651–669
- Shannon MC, Grieve CM, François LE (1994)** Whole-plant response to salinity. *In* *Plant Environment Interactions*. Wilkinson RF (ed), pp 199-244. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Sheaham JJ, Ribeiro-Neto L, Sussman MR (1993)** Cesium-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 3: 647-656.
- Shi H, Ishitani M, Kim C and Zhu JK (2000)** The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6896-6901.
- Shi HZ, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK (2002)** The putative plasma membrane $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter SOS1 controls long-distance Na^{+} transport in plants. *Plant Cell* 14: 465-477.
- Smith NA, Singh SP, Wang M-B, Stoutjesdijk P, Green A Waterhouse PM (2000)** Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407: 319-320.
- Snapp SS, Shennan C (1992)** Effects of salinity on roots growth and death dynamics of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *New Phytol* 121: 71-79

- Sottosanto JB, Gelli A, Blumwald E (2004)** DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J* 40: 752-771
- Stoutjesdijk PA, Singh SP, Liu Q, Hurlstone CJ, Waterhouse PA, Green AG (2002)** hpRNA-mediated targeting of *Arabidopsis* FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol* 129:1723–1731
- Sunarpi, Horie T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, Horie R, Chan WY, Leung H Y, Hattori K, Konomi M, Osumi M, Yamagami M, Schroeder JI, Uozumi N (2005)** Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J* 44: 928-938
- Sze H, Li X, Palmgren MG (1999)** Energization of plant cell membranes by H⁺ pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677-689.
- Taleisnik E, Grunberg K (1994)** Ion balance in tomato cultivars differing in salt tolerance. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. *Physiol Plant* 92: 528-534.
- Tarczynsky MC, Jensen RG, Bohner HJ (1993)** Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259: 508-510.
- Taylor CB (1996)** Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. *Plant Cell* 8: 1221-1224.
- Tester M, Davenport R (2003)** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot* 91: 503-527.
- Tester M, Bacic A (2005)** Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiol* 137: 791-793.
- Thiel G, Lynch J, Läuchli A (1988)** Short term effects of salinity stress on the turgor and elongation of growing barley leaves. *J Plant Physiol* 132: 38-44.
- Thompson JD, Higgins BG, Gibson TJ (1994)** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680.
- Tuteja N (2008)** Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants *Meths in Enzymol*, 428: 419-438
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T, Schroeder JI, (2000)** The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* 122: 1249-1259

- Vance V, Vaucheret H (2001)** RNA silencing in plants-defense and counter defense. *Science* 292: 2277–2280
- Venema K, Quintero FJ, Pardo JM, Donaire JP (2002)** The Arabidopsis Na^+/H^+ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na^+ and K^+ transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem* 277: 2413-2418
- Venema K, Belver A, Rodríguez-Rosales MP, Marín MC, Donaire JP (2003).** A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants. *J Biol Chem* 278: 22453-22459.
- Villalta I, Reina-Sanchez A, Bolarín M, Cuartero J, Belver A, Venema K, Carbonell E, Asins M (2008)** Genetic analysis of Na^+ and K^+ concentrations in leaf and stem as physiological components of salt tolerance in tomato *Theor Appl Genet* (2008) 116, 869-80
- Vinocur B, Altman A (2005)** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Op Biotechn* 16: 1-10.
- Voinnet O (2002)** RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 5:444–451
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC (2000)** A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103:157–167
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC (1998)** Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95:177–187
- Wang TB, Gassmann W, Rubio F, Schroeder JI, Glass ADM (1998)** Rapid upregulation of HKT1, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiol* 118: 651-659.
- Wang MB, Metzloff M (2005)** RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8: 216-222
- Watson JM, Fusaro AF, Wang M and Waterhouse PM (2005)** RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett.* 579, 5982–5987.
- Waterhouse PM, Helliwell CA (2003)** Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Rev Gen* 4:29-38
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbot D, Stoujesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG and Waterhouse PM (2001)** Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 581-590.

- Wilson C, Shannon MC (1995)** Salt-induced Na^+/H^+ antiport in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic species of tomato. *Plant Sci* 107: 147-157.
- Wu SJ, Ding L, Zhu JK (1996)** *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8, 617-627.
- Wu Y, Ding N, Zhao X, Zhao M, Chang Z, Liu J, Zhang L (2007)** Molecular characterization of PeSOS1: the putative Na^+/H^+ antiporter of *Populus euphratica*. *Plant Mol Biol* 65: 1-11.
- Xiong L, Zhu JK (2001)** Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant.* 112, 152-166.
- Xiong L, Zhu JK (2002)** Molecular and genetic aspects of osmotic stress responses in plants. *Plant, Cell Environ.* 25, 131-140.
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH (2006)** A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* 125, 1347-1360.
- Yamaguchi T, Blumwald E (2005)** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *T Plant Sci* 10: 615-620.
- Yang Q, Chen ZZ, Zhou XF, Yin HB, Li X, Xin XF, Hong XH, Zhu JK, Gong Z (2009)** Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) Genes Increases Salt Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Mol Plant* 2: 22-31.
- Yadav R, Flowers TJ, Yeo AR (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
- Yeo A (2007)** Salinity. In *Plant Solute Transport*. AY Yeo and TJ Flowers eds. Pp 340-370. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero FJ, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (2002)** Differential expression and function of Arabidopsis thaliana NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response. *Plant J* 30: 529-539.
- 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 JN, Williams JP, 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 X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* 1:1-6.

Zhu JK, Liu L, Xiong L (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10:1181-1191.

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.*; 53:247-73.

X. Apéndice

Tabla Ap1. Referencias de PLACE con los elementos reguladores en cis (Cis-regulatory sequences) identificados en la region promotora, que abarca 1500 pb aguas arriba del codon de inicio del clon genómico de *SISOS2*.

Factor o elemento	Loc.	(Cadena.)	Secuencia señal	Referencia
-300ELEMENT	site	28 (+)	TGHAARK	S000122
2SSEEDPROTBANAPA	site	467 (-)	CAAACAC	S000143
AMMORESIVDCRNIA1	site	108 (-)	CGAACTT	S000375
AMMORESIVDCRNIA1	site	161 (-)	CGAACTT	S000375
AMYBOX1	site	1246 (+)	TAACARA	S000020
ANAERO1CONSENSUS	site	963 (-)	AAACAAA	S000477
ARR1AT	site	323 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	827 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	1395 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	889 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	1299 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	50 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	73 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	126 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	179 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	714 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	738 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	1234 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	1402 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	1417 (+)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	33 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	221 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	490 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	583 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	595 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	644 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	726 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	819 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	980 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	1020 (-)	NGATT	S000454
ARR1AT	site	1159 (-)	NGATT	S000454
ASF1MOTIFCAMV	site	976 (-)	TGACG	S000024
BIHD1OS	site	524 (+)	TGTCA	S000498
BIHD1OS	site	564 (+)	TGTCA	S000498
BIHD1OS	site	388 (-)	TGTCA	S000498
BIHD1OS	site	1426 (-)	TGTCA	S000498
CAATBOX1	site	346 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	354 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	482 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	489 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	586 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	762 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	798 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	843 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	951 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	979 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1088 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1158 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1221 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1422 (+)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	26 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	43 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	52 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	96 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	102 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	149 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	155 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	202 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	229 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	259 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	661 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	736 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1090 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1097 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1204 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1323 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1413 (-)	CAAT	S000028
CAATBOX1	site	1424 (-)	CAAT	S000028

CACTFTPPCA1	site	924 (+)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	941 (+)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	1241 (+)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	1399 (+)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	276 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	358 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	466 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	540 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	624 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	1168 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	1309 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	1337 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	1488 (-)	YACT	S000449
CACTFTPPCA1	site	1495 (-)	YACT	S000449
CANBNNAPA	site	467 (-)	CNAACAC	S000148
CAREOSREP1	site	684 (+)	CAACTC	S000421
CAREOSREP1	site	901 (+)	CAACTC	S000421
CAREOSREP1	site	1107 (-)	CAACTC	S000421
CAREOSREP1	site	1385 (-)	CAACTC	S000421
CARGCW8GAT	site	957 (+)	CWWWWWWWWWG	S000431
CARGCW8GAT	site	957 (-)	CWWWWWWWWWG	S000431
CATATGGMSAUR	site	1162 (+)	CATATG	S000370
CATATGGMSAUR	site	1162 (-)	CATATG	S000370
CBFHV	site	55 (-)	RYCGAC	S000497
CCA1ATLHCB1	site	30 (+)	AAMAATCT	S000149
CCA1ATLHCB1	site	723 (+)	AAMAATCT	S000149
CCA1ATLHCB1	site	323 (-)	AAMAATCT	S000149
CCAATBOX1	site	345 (+)	CCAAT	S000030
CCAATBOX1	site	761 (+)	CCAAT	S000030
CCAATBOX1	site	797 (+)	CCAAT	S000030
CCAATBOX1	site	102 (-)	CCAAT	S000030
CCAATBOX1	site	155 (-)	CCAAT	S000030
CCAATBOX1	site	229 (-)	CCAAT	S000030
CCAATBOX1	site	259 (-)	CCAAT	S000030
CCAATBOX1	site	661 (-)	CCAAT	S000030
CEREGLUBOX1PSLEGA	site	1242 (-)	TGTTAAAGT	S000032
CIACADIANLELHC	site	817 (+)	CAANNNNATC	S000252
CIACADIANLELHC	site	211 (-)	CAANNNNATC	S000252
CIACADIANLELHC	site	1376 (-)	CAANNNNATC	S000252
CIACADIANLELHC	site	1418 (-)	CAANNNNATC	S000252
CPBCSPOR	site	249 (-)	TATTAG	S000491
DOFCOREZM	site	12 (+)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	396 (+)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	632 (+)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1272 (+)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1277 (+)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1307 (+)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1335 (+)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	474 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	530 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	770 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	916 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1011 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1026 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1034 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1243 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1288 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1460 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site	1465 (-)	AAAG	S000265
DRE2COREZMRAB17	site	55 (-)	ACCGAC	S000402
DRECRTCOREAT	site	55 (-)	RCCGAC	S000418
E2FCONSENSUS	site	846 (+)	WTTSSCSS	S000476
EBOXBNNAPA	site	384 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	611 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	1088 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	1162 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	1362 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	1422 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	384 (-)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	611 (-)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	1088 (-)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	1162 (-)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	1362 (-)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site	1422 (-)	CANNTG	S000144
ECCRCAH1	site	868 (+)	GANTTNC	S000494
ECCRCAH1	site	683 (-)	GANTTNC	S000494
ECCRCAH1	site	900 (-)	GANTTNC	S000494

ECCRCAH1	site	1017	(-)	GANTTNC	S000494
GARE1OSREP1	site	1246	(+)	TAACAGA	S000419
GATABOX	site	211	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	240	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	599	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	616	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	648	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	674	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	678	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	731	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	1078	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	1181	(+)	GATA	S000039
GATABOX	site	236	(-)	GATA	S000039
GATABOX	site	381	(-)	GATA	S000039
GATABOX	site	438	(-)	GATA	S000039
GATABOX	site	455	(-)	GATA	S000039
GATABOX	site	494	(-)	GATA	S000039
GATABOX	site	626	(-)	GATA	S000039
GATABOX	site	1210	(-)	GATA	S000039
GT1CONSENSUS	site	15	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	29	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	240	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	648	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	731	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1017	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1093	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1117	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1200	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1481	(+)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	845	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	878	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1052	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1124	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1357	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	234	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	285	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	327	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	532	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	556	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	804	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	911	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	967	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1035	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CONSENSUS	site	1053	(-)	GRWAAW	S000198
GT1CORE	site	749	(+)	GGTTAA	S000125
GT1CORE	site	312	(-)	GGTTAA	S000125
GT1CORE	site	341	(-)	GGTTAA	S000125
GT1CORE	site	757	(-)	GGTTAA	S000125
GT1GMSCAM4	site	29	(+)	GAAAAA	S000453
GT1GMSCAM4	site	285	(-)	GAAAAA	S000453
GT1GMSCAM4	site	327	(-)	GAAAAA	S000453
GT1GMSCAM4	site	532	(-)	GAAAAA	S000453
GT1GMSCAM4	site	556	(-)	GAAAAA	S000453
GT1GMSCAM4	site	911	(-)	GAAAAA	S000453
GT1GMSCAM4	site	967	(-)	GAAAAA	S000453
GT1GMSCAM4	site	1035	(-)	GAAAAA	S000453
GTGANTG10	site	61	(+)	GTGA	S000378
GTGANTG10	site	114	(+)	GTGA	S000378
GTGANTG10	site	167	(+)	GTGA	S000378
GTGANTG10	site	1198	(+)	GTGA	S000378
GTGANTG10	site	1416	(+)	GTGA	S000378
GTGANTG10	site	1471	(+)	GTGA	S000378
GTGANTG10	site	1496	(+)	GTGA	S000378
GTGANTG10	site	526	(-)	GTGA	S000378
GTGANTG10	site	1361	(-)	GTGA	S000378
IBOX	site	211	(+)	GATAAG	S000124
IBOX	site	616	(+)	GATAAG	S000124
IBOX	site	1181	(+)	GATAAG	S000124
IBOXCORE	site	211	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORE	site	240	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORE	site	599	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORE	site	616	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORE	site	648	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORE	site	731	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORE	site	1181	(+)	GATAA	S000199
IBOXCORE	site	235	(-)	GATAA	S000199
IBOXCORE	site	454	(-)	GATAA	S000199

INRNTPSADB	site	841 (+)	YTCANTYY	S000395
INRNTPSADB	site	949 (+)	YTCANTYY	S000395
INRNTPSADB	site	1219 (+)	YTCANTYY	S000395
INRNTPSADB	site	94 (-)	YTCANTYY	S000395
INRNTPSADB	site	147 (-)	YTCANTYY	S000395
INRNTPSADB	site	200 (-)	YTCANTYY	S000395
INRNTPSADB	site	1321 (-)	YTCANTYY	S000395
INRNTPSADB	site	1482 (-)	YTCANTYY	S000395
LBOXLERBCS	site	754 (+)	AAATTAACCAA	S000126
LECPLEACS2	site	800 (-)	TAAAATAT	S000465
LTRE1HVBLT49	site	558 (-)	CCGAAA	S000250
LTREATLTI78	site	54 (-)	ACCGACA	S000157
LTRECOREATCOR15	site	55 (-)	CCGAC	S000153
MARTBOX	site	425 (+)	TTWTWTWTWT	S000067
MARTBOX	site	1258 (+)	TTWTWTWTWT	S000067
MYB1AT	site	342 (+)	WAACCA	S000408
MYB1AT	site	758 (+)	WAACCA	S000408
MYB1AT	site	231 (-)	WAACCA	S000408
MYB1AT	site	261 (-)	WAACCA	S000408
MYB1AT	site	281 (-)	WAACCA	S000408
MYB2AT	site	574 (+)	TAACGTG	S000177
MYB2AT	site	451 (-)	TAACGTG	S000177
MYB2CONSENSUSAT	site	611 (+)	YAACKG	S000409
MYB2CONSENSUSAT	site	574 (+)	YAACKG	S000409
MYB2CONSENSUSAT	site	451 (-)	YAACKG	S000409
MYB2CONSENSUSAT	site	835 (-)	YAACKG	S000409
MYBCORE	site	451 (+)	CNGTTR	S000176
MYBCORE	site	459 (+)	CNGTTR	S000176
MYBCORE	site	577 (+)	CNGTTR	S000176
MYBCORE	site	748 (+)	CNGTTR	S000176
MYBCORE	site	835 (+)	CNGTTR	S000176
MYBCORE	site	611 (-)	CNGTTR	S000176
MYBCORE	site	313 (-)	CNGTTR	S000176
MYBCORE	site	574 (-)	CNGTTR	S000176
MYBCORE	site	1246 (-)	CNGTTR	S000176
MYBCOREATCYCB1	site	1328 (+)	AACGG	S000502
MYBCOREATCYCB1	site	316 (-)	AACGG	S000502
MYBCOREATCYCB1	site	835 (-)	AACGG	S000502
MYBCOREATCYCB1	site	1057 (-)	AACGG	S000502
MYBST1	site	1077 (+)	GGATA	S000180
MYBST1	site	455 (-)	GGATA	S000180
MYBST1	site	1210 (-)	GGATA	S000180
MYCATERD1	site	1362 (-)	CATGTG	S000413
MYCATRD22	site	1362 (+)	CACATG	S000174
MYCCONSUSAT	site	384 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	611 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	1088 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	1162 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	1362 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	1422 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	384 (-)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	611 (-)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	1088 (-)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	1162 (-)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	1362 (-)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	1422 (-)	CANNTG	S000407
NODCON2GM	site	1278 (-)	CTCTT	S000462
NTBBF1ARROLB	site	1242 (+)	ACTTTA	S000273
NTBBF1ARROLB	site	395 (-)	ACTTTA	S000273
OSE2ROOTNODULE	site	1278 (-)	CTCTT	S000468
P1BS	site	1173 (+)	GNATATNC	S000459
P1BS	site	1207 (+)	GNATATNC	S000459
P1BS	site	1173 (-)	GNATATNC	S000459
P1BS	site	1207 (-)	GNATATNC	S000459
POLASIG1	site	699 (+)	AATAAA	S000080
POLASIG1	site	23 (-)	AATAAA	S000080
POLASIG1	site	426 (-)	AATAAA	S000080
POLASIG1	site	771 (-)	AATAAA	S000080
POLASIG1	site	932 (-)	AATAAA	S000080
POLASIG1	site	1224 (-)	AATAAA	S000080
POLASIG1	site	1341 (-)	AATAAA	S000080
POLASIG1	site	1410 (-)	AATAAA	S000080
POLASIG2	site	90 (+)	AATTAAA	S000081
POLASIG2	site	143 (+)	AATTAAA	S000081
POLASIG2	site	196 (+)	AATTAAA	S000081
POLASIG2	site	412 (-)	AATTAAA	S000081
POLASIG2	site	1061 (-)	AATTAAA	S000081

POLASIG3	site	367 (+)	AATAAT	S000088
POLASIG3	site	550 (+)	AATAAT	S000088
POLASIG3	site	1253 (+)	AATAAT	S000088
POLASIG3	site	935 (-)	AATAAT	S000088
POLLENILELAT52	site	14 (+)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	1250 (+)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	1333 (+)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	287 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	329 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	534 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	830 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	871 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	913 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	917 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	969 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	1037 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	1066 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	1126 (-)	AGAAA	S000245
POLLENILELAT52	site	1152 (-)	AGAAA	S000245
PREATPRODH	site	336 (-)	ACTCAT	S000450
PREATPRODH	site	1165 (-)	ACTCAT	S000450
PREATPRODH	site	1485 (-)	ACTCAT	S000450
PRECONSCRHSP70A	site	672 (+)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNNNHHD	S000506
PRECONSCRHSP70A	site	1179 (+)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNNNHHD	S000506
PRECONSCRHSP70A	site	36 (-)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNNNHHD	S000506
PRECONSCRHSP70A	site	962 (-)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNNNHHD	S000506
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	site	529 (+)	CCTTTT	S000259
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	site	1271 (-)	CCTTTT	S000259
RAV1AAT	site	608 (+)	CAACA	S000314
RAV1AAT	site	70 (-)	CAACA	S000314
RAV1AAT	site	80 (-)	CAACA	S000314
RAV1AAT	site	123 (-)	CAACA	S000314
RAV1AAT	site	133 (-)	CAACA	S000314
RAV1AAT	site	176 (-)	CAACA	S000314
RAV1AAT	site	186 (-)	CAACA	S000314
REALPHALGLHCB21	site	343 (+)	AACCAA	S000362
REALPHALGLHCB21	site	759 (+)	AACCAA	S000362
REALPHALGLHCB21	site	230 (-)	AACCAA	S000362
REALPHALGLHCB21	site	260 (-)	AACCAA	S000362
RHERPATEXPA7	site	112 (-)	KCACGW	S000512
RHERPATEXPA7	site	165 (-)	KCACGW	S000512
ROOTMOTIFTAPOX1	site	374 (+)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	544 (+)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	570 (+)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	800 (+)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	1122 (+)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	483 (-)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	543 (-)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	569 (-)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	799 (-)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	site	1121 (-)	ATATT	S000098
RYREPEATBNNAPA	site	506 (-)	CATGCA	S000264
RYREPEATLEGUMINBOX	site	505 (-)	CATGCAY	S000100
S1FBOXSORPS1L21	site	1115 (+)	ATGGTA	S000223
SEBFCONSSTPR10A	site	523 (+)	YTGTCWC	S000391
SEF1MOTIF	site	374 (+)	ATATTTAWW	S000006
SEF4MOTIFGM7S	site	423 (+)	RTTTTTR	S000103
SEF4MOTIFGM7S	site	429 (+)	RTTTTTR	S000103
SEF4MOTIFGM7S	site	740 (+)	RTTTTTR	S000103
SEF4MOTIFGM7S	site	1236 (+)	RTTTTTR	S000103
SEF4MOTIFGM7S	site	1186 (+)	RTTTTTR	S000103
SEF4MOTIFGM7S	site	1432 (+)	RTTTTTR	S000103
SORLIP1AT	site	778 (+)	GCCAC	S000482
SORLREP3AT	site	1079 (-)	TGTATATAT	S000488
SP8BFIBSP8BIB	site	355 (-)	TACTATT	S000184
SREATMSD	site	454 (+)	TTATCC	S000470
TAAAGSTKST1	site	11 (+)	TAAAG	S000387
TAAAGSTKST1	site	395 (+)	TAAAG	S000387
TAAAGSTKST1	site	631 (+)	TAAAG	S000387
TAAAGSTKST1	site	770 (-)	TAAAG	S000387
TAAAGSTKST1	site	1243 (-)	TAAAG	S000387
TATABOX2	site	640 (+)	TATAAAT	S000109
TATABOX2	site	376 (-)	TATAAAT	S000109
TATABOX4	site	638 (+)	TATATAA	S000111
TATABOX4	site	637 (-)	TATATAA	S000111
TATABOX5	site	427 (+)	TTATTT	S000203
TATABOX5	site	936 (+)	TTATTT	S000203

TATABOX5	site	1225	(+)	TTATTT	S000203
TATABOX5	site	366	(-)	TTATTT	S000203
TATABOX5	site	549	(-)	TTATTT	S000203
TATABOX5	site	698	(-)	TTATTT	S000203
TATABOX5	site	1252	(-)	TTATTT	S000203
TATABOXOSPAL	site	547	(-)	TATTTAA	S000400
TATAPVTRNALEU	site	638	(-)	TTTATATA	S000340
TATCCAOSAMY	site	1076	(-)	TATCCA	S000403
TBOXATGAPB	site	1010	(+)	ACTTTG	S000383
TRANSINITDICOTS	site	907	(-)	AMNAUGGC	S000201
TRANSINITMONOCOTS	site	907	(-)	RMNAUGGC	S000202
WBOXATNPR1	site	387	(+)	TTGAC	S000390
WBOXATNPR1	site	1425	(+)	TTGAC	S000390
WBOXATNPR1	site	565	(-)	TTGAC	S000390
WBOXATNPR1	site	977	(-)	TTGAC	S000390
WBOXNTERF3	site	298	(-)	TGACY	S000457
WRKY71OS	site	388	(+)	TGAC	S000447
WRKY71OS	site	1426	(+)	TGAC	S000447
WRKY71OS	site	299	(-)	TGAC	S000447
WRKY71OS	site	525	(-)	TGAC	S000447
WRKY71OS	site	565	(-)	TGAC	S000447
WRKY71OS	site	977	(-)	TGAC	S000447

XI. Abreviaturas

ABA	Ácido Abscísico
ACMA	9-amino-6-chloro-2-methoxyacridina
Amp	Ampicilina
APD	Medio Arginina-Fosfato con glucosa para el cultivo de evaduras
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de suero bovina
BTP	Tampon Bis-Tris Propano
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimethyl sulfoxido
DNA(ADN)	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleosidos trifosfato (dATP+dCTP+dGTP+dTTP)
DO	Densidad optica
dsRNA	ARN doble cadena
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilen-diamino tetracetico
EGTA	Ethylene-bis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
F	Fluorescencia
F0	líneas transgénicas primarias
F1	Primera generación transgénica
F2	Segunda generación transgénica
F3	Tercera generación transgénica
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gramo(s)
GM	Medio de germinación
hpRNA	<i>hairpin</i> RNA
Kan	Kanamicina
kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani para el cultivo de bacterias
M	Molar
MAE	MOPS-acetato-EDTA
MES	Acido 2-(N morfolino) etanosulfonico
MS	Medio Murashige-Skoog para el cultivo de plantas
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propano sulfato
Oligo-dT	Oligonucleótido de politiminas
ORF	Marco abierto de lectura
³² P	Fósforo Radioactivo
pb	Pares de bases
PCM	Medio de precultivo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PF	Peso fresco

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
p/p	relación peso/peso
Pre-ARN	ARN precursor
p/v	Relación peso/volumen
PSE	Solución prehibridación
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RM-K	Medio de inducción de raíces
RNA(ARN)	Acido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR de transcripción reversa
SDS	N-dodecil sulfato sodico
SIM-K	Medio de inducción de tallo selectivo
SIM-NS	Medio de inducción de tallo no selectivo
siRNA	<i>Small interference RNAs</i>
TAE	Tampón Tris –Acético-EDTA para electroforesis de ADN
TBE	Tampón Tris –Bórico-EDTA para electroforesis de ADN
T-DNA	ADN de transferencia
TE	Tampón Tris-EDTA
Tm	Temperatura de fusión del oligonucleótido
Tris	Tampón Tris-(hidroximetil)-aminoetano
VIGS	silenciamiento génico inducido por virus
WM	Solución de lavado
YNB	Medio <i>Yeast-Nirogen-Base</i> para el cultivo de levaduras