



**CSIC**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

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

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

**TESIS DOCTORAL**

**Sobreexpresión en tomate de transportadores de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y  
sus proteínas reguladoras: papel en la homeostasis iónica**

**RAUL HUERTAS RUZ**

**Granada, 2011**





Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Raúl Huertas Ruz  
D.L.: GR 2436-2011  
ISBN: 978-84-694-2917-4



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

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

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

**Sobreexpresión en tomate de transportadores de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y  
sus proteínas reguladoras: papel en la homeostasis iónica**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el licenciado en Ciencias  
Bioquímicas, **Raúl Huertas Ruz**, para aspirar al Grado de Doctor

**Fdo. Raúl Huertas Ruz**

**VoBo Directores de la Tesis**

**Fdo. M<sup>a</sup> Pilar Rodríguez Rosales**  
Doctora en Ciencias Biológicas  
Científico Titular del CSIC

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

**Fdo. Cornelis M. Venema**  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Científico Titular del CSIC

**GRANADA, 2011**



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.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía, Incentivos a Proyectos de Excelencia (AGR-436) “Aproximación biotecnológica para la mejora del cultivo del tomate en la eficiencia del uso del agua y del potasio en situaciones de salinidad: papel de los transportadores iónicos”



*Durante la escritura de esta tesis han sido muchos los recuerdos de anécdotas, agradables algunas y otros quizás algo menos, y por supuesto nombres de personas, algunas relacionadas directamente con el trabajo, y otras no tan directamente, pero que a su manera han tenido que ver con la realización del mismo. Imposible citarlos a todos y en la medida que se merecen. Por este motivo me limitaré a citar brevemente a aquellas personas que mas directamente han influido en la realización de esta Tesis Doctoral.*

*En primer lugar mis directores, Pilar Rodríguez, Andres Belvel y Kees Venema. A Pilar por darme la oportunidad de reintroducirme en el mundo de la investigación. A Kees por estar siempre disponible y por todos sus sabios consejos. A Andres por su labor científica, por su apoyo incondicional y por su amistad.*

*También quiero expresar mi agradecimiento a Raquel Olías, siempre dispuesta a echar una mano y a aportar buenas ideas. A Olivier Cagnac, porque siempre tiene tiempo para ayudarte, por sus bromas y por los buenos años nuevos que hemos celebrado juntos. A Isabel, por los buenos consejos, por el trabajo que realiza para todos y por esas grandes tertulias a las 7:30 de la mañana. Al resto de los componentes de mi grupo, Zakia, Kifah, Mourad y especialmente a Nieves y Fran, porque sois más que compañeros y porque el trabajo rodeada de gente como vosotros es mucho más agradable. Gracias chic@s.*

*Existen otras personas que han influido sustancialmente a que esta tesis se realizara. Por eso agradezco a Juan de Dios Barajas y Ana Sanchez a ayudarme a*

*entrar en la Estacion, por su amistad como compañeros de trabajo, de piso, fiestas y colacaos, y un largo etc que los convierte en mi familia. A Juan de Dios Alche, por ayudarme siempre y por esa pluma con la que voy a firmar esta Tesis Doctoral. A Jose Carlos Jimenez por su ayuda en mis inicios científicos y su gran amistad.*

*No pueden faltar en estas líneas a toda la gente con las que he compartido las comidas, desayunos, tapas, partidos de futbito y un largo etcétera, por tantos buenos momentos que hemos pasado junt@s, dentro y fuera de esta nuestra Estación.*

*A mis padres, que me han permitido llegar hasta donde estoy y que ne animan siempre a mejorar. Al resto de mi familia de Lopera, por apoyarme siempre. A mi abuela Luisa, que aunque ya no esta con nosotros, siempre la recordaré.*

*A Quina y Beatriz, por enseñarme que lo mas importante esta fuera del trabajo.*

*A tod@s y cada un@ de vosotr@s GRACIAS*



**A Quina y Beatriz**



“Si se define la inteligencia como la capacidad de resolver problemas, las plantas tienen mucho que enseñarnos.

Stefano Mancuso

“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos”.

Aristóteles (384 a.C.- 322 a.C.)



## ÍNDICE



<b>I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>II. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS</b> .....	<b>13</b>
<b>A1. PROBLEMÁTICA DE LA SALINIDAD EN LA AGRICULTURA.</b> .....	<b>15</b>
<b>A2. TOLERANCIA DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD.</b> .....	<b>18</b>
<b>A3. EFECTOS DE LA SALINIDAD SOBRE LAS PLANTAS.</b> .....	<b>20</b>
<b>A4. MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD.</b> .....	<b>25</b>
A4.1 MANTENIMIENTO DEL EQUILIBRIO OSMÓTICO.....	25
A4.2 MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS IÓNICA.....	28
<b>A5. TRANSPORTADORES IMPLICADOS EN LA HOMEOSTASIS DE <math>Na^+</math> Y <math>K^+</math>.</b> .....	<b>32</b>
A5.1. ENTRADA DE $Na^+$ Y $K^+$ .....	33
A5.2. EXTRUSIÓN O COMPARTIMENTACIÓN ACTIVA DE $Na^+$ .....	40
A5.2.1. <i>Eflujo de <math>Na^+</math></i> .....	41
A5.2.2. <i>Compartimentación vacuolar de <math>Na^+</math> y <math>K^+</math></i> .....	43
A5.3. TRANSPORTE DE $Na^+$ A LARGA DISTANCIA.....	44
<b>A6. TRANSPORTADORES NHX.</b> .....	<b>49</b>
A6.1. FUNCIÓN DE LOS ANTIPTADORES NHX.....	53
A6.1.1. <i>Tolerancia a la salinidad</i> .....	53
A6.1.2. <i>Homeostasis de <math>K^+</math></i> .....	57
A6.1.3. <i>Regulación del pH celular</i> .....	59
<b>A7. RUTA SOS: DESCRIPCIÓN DE SUS COMPONENTES</b> .....	<b>60</b>
A7.1. SOS1.....	62
A7.2. SOS2.....	67
A7.3. SOS3.....	70
<b>A8. TRANSPORTADORES NHAD</b> .....	<b>72</b>
<b>A9. EL TOMATE COMO PLANTA MODELO EN LOS ESTUDIOS DE SALINIDAD.</b> .....	<b>74</b>
<b>A10. ESTRATEGIAS GENÉTICAS PARA LA MEJORA DE LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD.</b> .....	<b>77</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>89</b>
<b>M1. MATERIAL BIOLÓGICO.</b> .....	<b>91</b>
M1.1. BACTERIAS.....	91
M1.1.1. <i>Cepas utilizadas</i> .....	91
M1.1.2. <i>Cultivo bacteriano</i> .....	91
M1.1.3. <i>Obtención de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i></i> .....	92
M1.1.4. <i>Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i></i> .....	93
M1.2. MATERIAL VEGETAL.....	93
M1.2.1. <i>Esterilización de semillas</i> .....	93
M1.2.2. <i>Germinación de semillas in vitro</i> .....	94
M1.2.3. <i>Cultivo en suelo</i> .....	94
M1.2.4. <i>Cultivo en sistema hidropónico</i> .....	94

M1.2.5. Transformación de cotiledones de tomate.....	96
M1.2.6. Regeneración de plantas a partir de los cotiledones transformados.....	97
M1.2.7. Selección de transformantes y propagación de líneas transgénicas.....	100
M1.2.8. Recolección y conservación de semillas de plantas transformadas.....	102
M1.2.9. Tratamientos salinos y de deficiencia en potasio.....	103
M1.2.10. Evaluación del fenotipo.....	104
<b>M2. MÉTODOS.....</b>	<b>105</b>
M2.1. MÉTODOS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	105
M2.1.1. Amplificación por PCR.....	106
M2.1.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	107
M2.1.3. Cuantificación de DNA y RNA.....	108
M2.1.4. Aislamiento de DNA plasmídico.....	108
M2.1.5. Aislamiento de DNA genómico de tomate.....	109
M2.1.6. Aislamiento de RNA de tomate.....	109
M2.1.7. Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	111
M2.1.8. Análisis Southern del DNA genómico de tomate.....	111
M2.1.9. PCR a tiempo real.....	114
M2.2. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS CELULARES.....	116
M2.2.1. Obtención de microsomas.....	116
M2.2.2. Aislamiento de endomembranas.....	117
M2.2.3. Purificación de vesículas de plasmalema.....	118
M2.2.4. Purificación de vesículas de tonoplasto.....	118
M2.2.5. Cuantificación de proteínas.....	120
M2.2.6. Determinación de la actividad de intercambio Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> en vesículas de membrana.....	120
M2.2.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	122
M2.2.8. Tinción de proteínas separadas por electroforesis.....	122
M2.2.9. Electrotransferencia e inmunodetección.....	123
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>125</b>
<b>R1. SOBREEXPRESIÓN DE LENHX2 EN TOMATE.....</b>	<b>127</b>
R1.1. OBTENCIÓN DE PLANTAS HOMOCIGOTAS Y MONO-LOCUS PARA EL TRANSGEN.....	127
R1.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LENHX2.....	130
R1.3. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PLANTAS SOBREEXPRESORAS LENHX2.....	131
R1.4. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE TRANSPORTE IÓNICO EN ENDOMEMBRANAS..	136
R1.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS SISTEMAS DE ABSORCIÓN DE K <sup>+</sup> DE ALTA AFINIDAD, HAK, EN LAS PLANTAS SOBREEXPRESORAS LENHX2.....	138
<b>R2. SOBREEXPRESIÓN DE SLSOS2 EN TOMATE.....</b>	<b>139</b>
R2.1. OBTENCIÓN DE PLANTAS HOMOCIGOTAS Y MONO-LOCUS PARA EL TRANSGEN.....	139
R2.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE SLSOS2.....	141
R2.3. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PLANTAS SOBREEXPRESORAS SLSOS2.....	141
R2.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SLSOS1, LENHX2 Y LENHX4 EN LAS PLANTAS SOBREEXPRESORAS DE SLSOS2.....	148



---

R2.5. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE TRANSPORTE IÓNICO EN TONOPLASTO Y MEMBRANA PLASMÁTICA EN PLANTAS SOBREPRESORAS DE SLSOS2.....	150
<b>R3. SOBREPRESIÓN DE SLSOS3 EN TOMATE. ....</b>	<b>153</b>
R3.1. OBTENCIÓN DE PLANTAS HOMOCIGOTAS Y MONO-LOCUS PARA EL TRANSGEN. ....	153
R3.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE SLSOS3. ....	155
R3.3. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PLANTAS SOBREPRESORAS SLSOS3. ....	156
R3.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA RUTA SOS EN PLANTAS SOBREPRESORAS DE SLSOS3.....	162
<b>R4. SOBREPRESIÓN DE SLNHAD EN TOMATE. ....</b>	<b>168</b>
R4.1. OBTENCIÓN DE PLANTAS HOMOCIGOTAS Y MONO-LOCUS PARA EL TRANSGEN. ....	168
R4.2. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PLANTAS SOBREPRESORAS SLNHAD. ....	170
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>173</b>
<b>D1. PLANTAS SOBREPRESORAS DE LENHX2. ....</b>	<b>175</b>
<b>D2. PLANTAS SOBREPRESORAS DE SLSOS2. ....</b>	<b>181</b>
<b>D3. PLANTAS SOBREPRESORAS DE SLSOS3. ....</b>	<b>189</b>
<b>D4. PLANTAS SOBREPRESORAS DE SLNHAD. ....</b>	<b>197</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>201</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>207</b>



## **I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



El incremento en la salinidad de los suelos, debido en parte al abuso de fertilizantes y la irrigación con aguas de baja calidad de alto contenido en sales, tiene un efecto negativo para la producción agrícola, además de plantear una seria amenaza medioambiental. Existe una importante relación entre la eficiencia en el uso de nutrientes y el estrés salino, ya que la alta salinidad del medio afecta de forma esencial a la absorción y distribución de nutrientes, especialmente de  $K^+$ , por parte de las plantas. Esta perturbación de la homeostasis de  $K^+$ , resultante de la competición entre  $Na^+$  y  $K^+$ , es un fenómeno determinante de la toxicidad del sodio. Por consiguiente, el mantenimiento de altas concentraciones de  $K^+$  y bajas concentraciones de  $Na^+$  en las células vegetales es fundamental para evitar los efectos tóxico y osmótico del estrés salino, constituyendo por ello una de las claves de la tolerancia de las plantas a este factor.

Para conseguir mantener la homeostasis del  $K^+$  y evitar la toxicidad del  $Na^+$  es esencial, de un lado, la exclusión activa de  $Na^+$  a nivel de plasmalema y su compartimentación en la vacuola donde contribuye a la turgencia celular y, de otro, el mantenimiento de valores de pH y niveles de  $K^+$  adecuados en el citoplasma y compartimentos intracelulares, lo que contribuye a regular el volumen y las actividades enzimáticas celulares (Maathuis y Amtmann, 1999, Venema et al., 2003, Sze et al., 2004). En este sentido, la identificación y el estudio de los mecanismos de regulación de transportadores iónicos relacionados con la tolerancia a la salinidad y la distribución de potasio en las células vegetales es un enfoque de gran interés desde el punto de vista de la investigación básica y constituye un paso previo a la aplicación de estrategias biotecnológicas que podrían permitir solventar los efectos negativos de la salinidad en cultivos de interés agronómico, como es el tomate.

Como resultado de los estudios desarrollados en el grupo de investigación en que se ha realizado esta Tesis Doctoral se han identificado varios transportadores NHX de tomate que son importantes para la homeostasis del potasio, la tolerancia a

la salinidad y, posiblemente, el desarrollo de la planta y la producción de frutos. Así mismo, se han identificado en tomate los componentes de la ruta SOS, poniéndose de manifiesto mediante estudios de complementación heteróloga, la participación de estas proteínas en la respuesta al estrés salino. Partiendo de estos antecedentes, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el potencial biotecnológico de algunas de estas proteínas, en concreto LeNHX2, SISOS2, SISOS3 y SINhaD, en relación a la tolerancia a la salinidad en plantas de tomate. Para ello, se ha seguido una estrategia de sobreexpresión génica en tomate y se ha llevado a cabo la caracterización fenotípica de las plantas transgénicas y el estudio de alguno de los mecanismos bioquímicos responsables de los fenotipos observados.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

- 1. Generación de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresen las proteínas LeNHX2, SISOS2, SISOS3 y SINhaD.** Se han obtenido plantas T3 del cultivar MicroTom mono-locus y homocigóticas para cada uno de los transgenes. Se han caracterizado molecularmente estas plantas, determinando los niveles de sobreexpresión de los genes.
- 2. Análisis de los fenotipos de las plantas transgénicas en relación a la tolerancia a la salinidad y a la baja disponibilidad de potasio.** Se ha estudiado el crecimiento, así como la producción de flores y frutos en las plantas transgénicas cultivadas en condiciones de estrés salino o deficiencia en potasio. Se ha analizado también la composición mineral en los tejidos de estas plantas.
- 3. Estudio del de transporte iónico en membranas aisladas.** Se han purificado membranas plasmática y vacuolar de raíces de plantas transgénicas y se ha determinado mediante técnicas fluorimétricas el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en dichas membranas.

- 4. Estudio del efecto de la sobreexpresión de LeNHX2 y SISOS2 sobre los niveles de transcritos de algunos transportadores iónicos.** Se ha determinado, mediante RT-PCR en tiempo real la expresión del transportador de  $K^+$  de alta afinidad tipo HAK en plantas sobreexpresoras de LeNHX2, así como la expresión de los transportadores SISOS1, LeNHX2 y LeNHX4 en plantas sobreexpresoras de SISOS2.





## **II. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS**



### **A1. Problemática de la salinidad en la agricultura.**

El planeta Tierra presenta alrededor del 71 % de su superficie cubierta por océanos y mares, es decir, agua salada con una concentración de aproximadamente 30 g NaCl/l (Flowers, 2004; Dajic, 2006). De la superficie restante, casi un 15 % está afectada por la salinidad (Pessarakli y Szabolcs, 1994; Shabala y Cuin, 2008; Tóth et al., 2008). La salinidad está presente en prácticamente todas las regiones climáticas y en una amplia gama de altitudes, siendo muy frecuente en regiones áridas y semiáridas de Asia, Australia, África y América del Sur. Además, la salinidad del suelo afecta a alrededor de 1 millón de hectáreas en la Unión Europea, principalmente en los países del Mediterráneo (Dajic, 2006; Lakhdar et al., 2009).

La mayoría de las áreas afectadas por la salinidad han surgido por causas naturales. La llamada salinidad natural o primaria es el resultado de la acumulación de sales solubles en suelos o aguas subterráneas durante largos periodos geológicos, principalmente debido al desgaste de rocas que liberan su contenido en sales. La salinidad es un fenómeno asociado a varios tipos de sales, fundamentalmente cloruros de sodio (la sal más soluble), calcio y magnesio y, en menor medida, sulfatos y carbonatos de sodio, calcio y magnesio (Szabolcs, 1989; Dajic, 2006). La salinidad natural también es provocada por la deposición de sales oceánicas transportadas por el viento y la lluvia (Munns y Tester, 2008).

Además de la salinidad natural, existe otro tipo de salinidad, denominada secundaria, provocada por la actividad humana. Este fenómeno afecta a la Humanidad desde el inicio de la Agricultura, y existen registros históricos de migraciones provocadas por la salinización del suelo cultivable (Gelburd, 1985). La actividad humana ha incrementado la extensión de áreas salinizadas al ampliarse las zonas de regadío con el desarrollo de grandes proyectos hidrológicos, lo que ha provocado cambios en el balance de agua y sales de los sistemas hidrogeológicos. De esta forma, los problemas de salinización secundaria se deben a un mal uso de las

aguas para riego (uso de agua en exceso, sistemas de riego poco eficientes, sistemas de distribución defectuosos, drenaje restringido, uso de aguas de mala calidad o malas prácticas de riego), que conduce a un incremento paulatino de la salinidad del suelo (Bressler y Hoffman, 1986; Serrano, 1996; Tuteja, 2007). Este problema se agudiza especialmente en franjas costeras, donde la sobreexplotación de acuíferos, está produciendo la salinización del suelo, por intrusión de agua de mar.

La salinización secundaria conduce a una progresiva degradación del suelo que acaba afectando a la agricultura. Este proceso produce cada año el deterioro de aproximadamente 2 millones de hectáreas (casi el 1 % del suelo agrícola a escala mundial) (Tuteja, 2007; Athar y Ashraf, 2009). Además de la irrigación, otras actividades humanas que conducen a la salinización secundaria son el exceso de pastoreo, la deforestación de áreas semihúmedas o semiáridas, la contaminación con sustancias químicas y el mal uso de los fertilizantes (Pessarakli y Szabolcs, 1994; Dajic, 2006).

Según el Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA) se espera que el crecimiento de la población humana alcance los 9300 millones de habitantes en 2050 (<http://www.unfpa.org/swp/2009/>). Por ello, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) indica que para hacer frente a este aumento de población, se hace necesario un incremento de la producción global de alimentos en torno al 70 % en los próximos 40 años para asegurar la alimentación (FAO 2009, <http://www.fao.org/>). Ello implicaría no solo sobreexplotar las tierras ya cultivadas, sino buscar nuevas áreas donde llevar a cabo la actividad agrícola, teniendo que dirigir nuestra mirada hacia las zonas áridas y semiáridas en las que es frecuente una alta salinidad de los suelos y en las que los factores climáticos (insolación intensa, altas temperaturas, baja pluviosidad) determinan la necesidad de irrigación.

La gravedad de la problemática de la salinidad en la agricultura se constata en el hecho de que de los actuales 260 millones de hectáreas de terreno sometido a

irrigación, 45 millones (~20 %) están afectados por la salinidad (Flowers, 2004; Shabala y Cuin, 2008; Athar y Ashraf, 2009; Lakhdar et al., 2009), especialmente las zonas más productivas, como California, el sur de Asia y gran parte del área mediterránea (Pisinaras et al., 2009). 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 (Dajic, 2006; FAO 2008 - <http://www.fao.org/nr/land/degradation/es>) (Tabla A1).

**Tabla A1.** Distribución regional de suelos afectados por la salinidad (en millones de hectáreas).

Regiones	Área Total (Mha)	Suelos afectados por la salinidad	
		Superficie (Mha)	%
África	1899	73	3,4
Asia y Australia	3107	444	14,3
Europa	2011	80	3,9
América Latina	2039	112	5,5
Oriente Próximo	1802	106	5,9
Norte América	1924	20	1,0
Total	12781	831	6,5
Salinización secundaria en los suelos irrigados		45,4	20

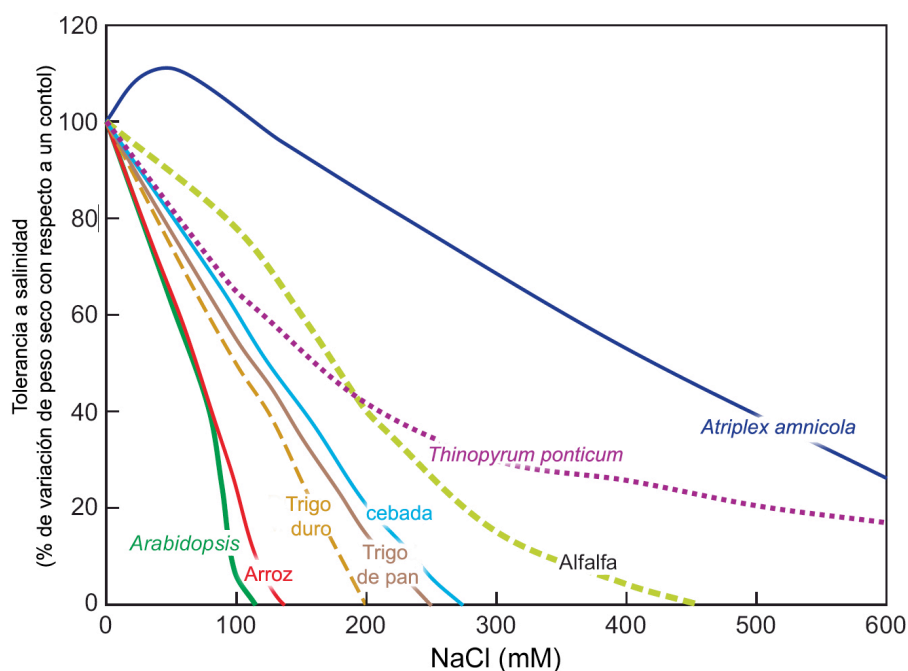
Aunque la superficie irrigada constituye sólo el 15 % del total la superficie cultivada, su productividad es al menos dos veces superior a la del suelo cultivable que sólo recibe el agua de la lluvia, lo que explica que las explotaciones agrícolas sometidas a irrigación produzcan un tercio del alimento mundial (Munns y Tester, 2008).

La solución al problema de la salinidad pasa por mejorar las prácticas de cultivo para prevenir la salinización del suelo o implementar planes para remediar su salinización (uso de aguas de riego de alta calidad, instalación de sistemas de lavado

y drenaje de suelos, eliminación del exceso de sodio del suelo mediante la adición de óxido o sulfato cálcico). Aún así son soluciones costosas y no suficientemente eficaces. Por ello, una alternativa para afrontar el problema de la salinidad en agricultura es aumentar la tolerancia de las plantas al NaCl, ya sea por técnicas tradicionales de mejora, de éxito limitado, debido a la complejidad fisiológica y genética de este rasgo (Flowers, 2004; Shabala y Cuin, 2008) o mediante uso de tecnologías de ingeniería genética (Tester y Davenport, 2003).

## A2. Tolerancia de las plantas a la salinidad.

Las plantas presentan diferentes respuestas de crecimiento frente al estrés salino (Munns y Tester, 2008). A partir de una concentración umbral de sales, la capacidad de tolerancia variará en función del estadio de desarrollo de la planta, de las interacciones ambientales, del tipo de ión y de la especie vegetal (Foolad, 2007).



**Figura A1.** Variación en el peso seco de la parte aérea de distintas especies de plantas cultivadas durante tres semanas en presencia de NaCl, respecto al valor de peso seco de plantas cultivadas en ausencia de NaCl. Modificado de Munns y Tester (2008).

Existe una alta variabilidad en la tolerancia al estrés salino entre grupos de plantas taxonómicamente distintos, pero también entre especies estrechamente relacionadas, e incluso entre variedades de una misma especie y entre individuos de una misma línea varietal (Tester y Davenport, 2003; Figura A1).

En base a 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: halófitas, halófitas y glicófitas tolerantes y glicófitas muy sensibles (Greenway y Munns, 1980; Tabla A2).

**Tabla A2.** Clasificación de las plantas según su capacidad de tolerar altas concentraciones de NaCl sin daño aparente. Modificado de Greenway y Munns (1980).

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

El tomate pertenece a un grupo de sensibilidad intermedia, aunque puede existir variación interespecífica e intraespecífica con la existencia de especies y de

variedades cultivadas que presentan una tolerancia diferencial a la salinidad, y en las que la altura del tallo y el crecimiento de la hoja son los parámetros de crecimiento más afectados (Cuartero et al., 1992; Pérez-Alfocea et al., 1993; Cuartero y Fernández-Muñoz 1999; Cuartero et al., 2006).

### **A3. Efectos de la salinidad sobre las plantas.**

La salinidad produce a nivel morfológico, fisiológico y molecular una amplia variedad de respuestas, tales como la reducción del turgor, inhibición de las funciones de membrana, alteración de determinadas actividades enzimáticas, producción de radicales libres, disminución de la fotosíntesis e inducción de deficiencias iónicas. El ión  $\text{Cl}^-$  puede interferir con los sitios aniónicos implicados en el ligamiento de ARN y con metabolitos aniónicos como bicarbonatos, carboxilatos y azúcares fosfatos. De otro lado, el  $\text{Na}^+$  puede interferir con los sitios catiónicos implicados en el ligamiento de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . 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 (Waisel, 1972; Flowers et al., 1977; Greenway y Munns, 1980; Munns et al., 1983; Ungar, 1991; Shannon et al., 1994; Serrano y Gaxiola, 1994; Serrano, 1996; Yeo 1998; Serrano et al., 1999; Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2000; Munns, 2002; Xiong y Zhu, 2002; Yokoi et al., 2002a; Tester y Davenport, 2003; Botella et al., 2005; Dajic, 2006; Tuteja 2007; Yeo, 2007; Munns y Tester, 2008; Shabala y Cuin, 2008; Ehsanzadeh et al., 2009).

La acción negativa de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se debe a la combinación de varios efectos (Greenway y Munns, 1980; Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2002): a) la salinidad produce en la planta un estado fisiológico similar al causado por el estrés hídrico, es más, ambos tipos de estrés se superponen, ya que una alta concentración de sal en el suelo genera un estrés osmótico que conduce al establecimiento de una zona de bajo potencial hídrico que dificulta la absorción de



agua por las raíces de las plantas; b) la salinidad puede generar una toxicidad iónica específica asociada normalmente a la excesiva absorción de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ; c) el exceso de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$  conduce a una menor absorción de nutrientes minerales o a una alteración de la distribución de iones esenciales como el  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , nitrato o fosfato; determinando una alteración nutricional, y d) la salinidad conlleva procesos de estrés oxidativo secundario debidos a la generación de especies de oxígeno y nitrógeno reactivas (ROS y RNS).

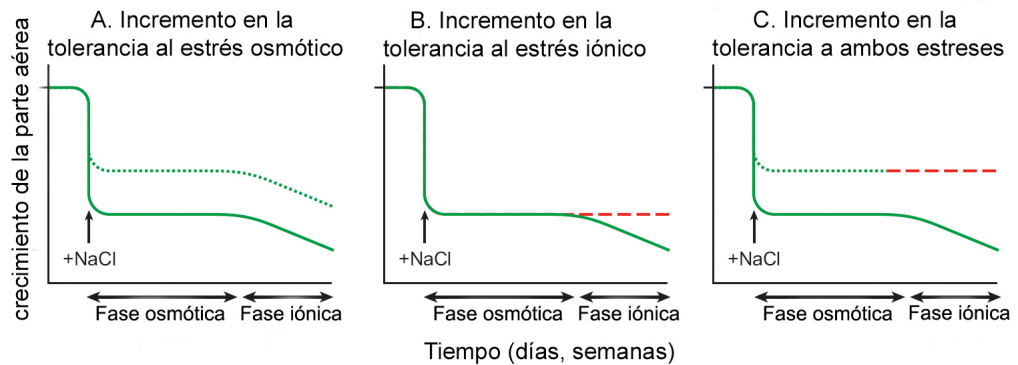
El efecto osmótico conlleva una disminución de la capacidad de absorber agua por parte de la planta lo que supone una reducción de la expansión foliar y una pérdida de turgencia. De manera general, el efecto osmótico en plantas sensibles provoca, a largo plazo, una reducción del crecimiento de la parte aérea y, en menor grado, de las raíces (Munns et al., 2000a, Munns, 2002; Zhu, 2002; Tester y Davenport, 2003; Tuteja, 2007). La concentración umbral de NaCl en el medio de crecimiento de las raíces a partir de la cual empiezan a ser visibles los efectos osmóticos es de aproximadamente 40 mM. Por encima de esta concentración, la mayor parte de las células pierden agua, por lo que para mantener la actividad citosólica, el agua pasa desde la vacuola al citosol, lo que conlleva una pérdida transitoria del volumen y el turgor celular. En unas horas las células recuperan el volumen y turgor original debido al ajuste osmótico, pero a pesar de ello, se reduce la tasa de elongación celular (Yeo et al., 1991; Passioura y Munns, 2000; Cramer, 2002; Fricke y Peters, 2002), produciéndose cambios en las dimensiones de la célula (Shabala y Cuin, 2008; Munns y Tester, 2008). También se reduce la velocidad de división celular, lo que conduce a una ralentización en la aparición y crecimiento de las hojas. Por otro lado, los brotes laterales dejan de crecer y se forman menos ramas. Además, se afecta el desarrollo reproductivo, produciéndose floración temprana o reducción del número de botones florales (Munns y Tester, 2008).

La toxicidad iónica es producida por la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el citosol de la célula que es perjudicial para su supervivencia (Zhu, 2002; Munns y Tester,

2008). En algunas plantas perennes, sobre todo leñosas (como los cítricos y la vid), el  $\text{Na}^+$  es almacenado en las raíces y tallos leñosos, mientras que el  $\text{Cl}^-$  se acumula en las ramas jóvenes, siendo más perjudicial para la planta (Flowers, 1988). Sin embargo, para la mayoría de las plantas, entre ellas las gramíneas, el  $\text{Na}^+$  es la causa principal de toxicidad iónica (Tester y Davenport, 2003). El crecimiento de la planta se ve afectado en condiciones salinas ya que la acumulación de  $\text{Na}^+$  causa la necrosis de las hojas más viejas, primero en los bordes y posteriormente en el interior. Cuando las hojas más viejas detienen el crecimiento, no pueden diluir la sal que les llega, tal como ocurre en las hojas jóvenes en crecimiento y, por ello, mueren. Si la tasa de muerte de las hojas viejas es mayor que la de producción de hojas nuevas, se verá afectada la capacidad fotosintética de la planta, que no será capaz de suministrar los hidratos de carbono que requieren las hojas jóvenes, lo cual reduce aun más los niveles de crecimiento y producción de la planta (Munns, 1993, Munns, 2002, Munns y Tester, 2008). La escala de tiempo en la cual se manifiesta el daño específico del ión  $\text{Na}^+$  depende de su tasa de acumulación en hojas, y de la eficacia de su compartimentación en células de la hoja.

A bajas concentraciones de  $\text{NaCl}$ , el componente osmótico del estrés salino ejerce un efecto sobre la tasa de crecimiento mayor que el provocado por el estrés iónico. A altas concentraciones de  $\text{NaCl}$  o en especies sin capacidad de regular el transporte de  $\text{Na}^+$ , el efecto iónico domina sobre el efecto osmótico (Munns y Tester, 2008). De esta forma, actualmente se acepta que el efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento sigue un modelo bifásico, consistente en una fase muy temprana debida a la reducción del suministro de agua generado por el aumento de presión osmótica externa (fase osmótica), y una respuesta tardía (días, semanas, dependiendo de la especie) debida a la alta concentración intracelular de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , que provoca daños a nivel celular y acelera la senescencia de las hojas (fase iónica) (Figura A2). Si la velocidad de producción de nuevas hojas es mayor que la de 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 A2.** Efecto del estrés salino sobre la tasa de crecimiento de las plantas: repuesta temprana (fase osmótica) y repuesta tardía (fase iónica). La línea continua verde representa el cambio de la tasa de crecimiento después de la adición de NaCl. (a) La línea verde discontinua representa la respuesta hipotética de una planta con mayor tolerancia al componente osmótico del estrés salino. (b) La línea roja discontinua representa la respuesta de una planta con mayor tolerancia al componente iónico del estrés salino. (c) La línea verde-roja discontinua representa la respuesta de una planta con mayor tolerancia a los componentes osmótico e iónico del estrés salino. Tomado de Munns y Tester (2008).

La salinidad no sólo dificulta la absorción de agua por la planta sino también la de nutrientes minerales, pudiendo conducir a una situación de desequilibrio nutricional (Silberbush y Ben-Asher, 2001). El efecto directo del  $\text{Na}^+$  sobre la toma de otros nutrientes se debe a la interferencia de este ión con la actividad de transporte iónico a nivel de la membrana celular de la raíz, afectando fundamentalmente a transportadores y canales de iones  $\text{K}^+$ , lo que impide la toma de este macronutriente. Por otro lado, el componente osmótico de la salinidad junto a los efectos perjudiciales del  $\text{Na}^+$  sobre la estructura de suelo (Wild, 1988), provocan una inhibición en el crecimiento de la raíz que también afecta a la toma de nutrientes.

La alteración provocada por el  $\text{Na}^+$  en la toma de  $\text{K}^+$  conlleva un cambio en la razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de la célula. Los iones  $\text{K}^+$  son esenciales para el equilibrio osmótico y el balance electrostático de las células y sus compartimentos, para la función de

muchas enzimas, y/o la síntesis de proteínas (p.e. la unión del tRNA a los ribosomas requiere  $K^+$ ) (Blaha et al., 2000). El  $Na^+$  tiene capacidad de competir con el  $K^+$  para unirse a sitios esenciales debido a la semejanza en propiedades fisicoquímicas de ambos. Sin embargo, el  $Na^+$  no puede sustituir al  $K^+$  en sus funciones, excepto quizás en las osmóticas (Bhandal y Malik, 1988; Tester y Davenport, 2003). Por estas razones, el exceso de  $Na^+$  está implicado en la inhibición de muchos procesos metabólicos o enzimáticos como la fotosíntesis, la generación de estrés oxidativo a través de la producción de especies de oxígeno activado, la absorción de  $CO_2$  a través de los estomas y el crecimiento en general (Pollard y Wyn Jones, 1979; Wyn Jones y Pollard, 1983; Termaat et al., 1985; Trejo et al., 1993; Paul y Foyer, 2001; Zhu, 2001; Apel y Hirt, 2004; Fricke et al., 2004; Davies et al., 2005; Foyer y Noctor, 2005; Logan, 2005; Vinocur y Altman, 2005; Dajic, 2006; Fricke et al., 2006; Shoji et al., 2006; Tuteja, 2007; Munns y Tester, 2008).

El estrés oxidativo derivado del estrés salino, como ocurre en otros estreses abióticos, produce una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que es dañina para las células, ya que causa 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 (ascorbato, glutation,  $\alpha$ -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 para los enzimas antioxidantes incrementan en respuesta a ROS bajo condiciones de estrés abiótico y, específicamente, en situaciones de salinidad (Ashraf, 2009).

#### **A4. Mecanismos de tolerancia a la salinidad.**

Los mecanismos de tolerancia a la salinidad descansan sobre varios aspectos interrelacionados, ya referidos anteriormente. Se requiere del mantenimiento del equilibrio osmótico en relación con el tonoplasto y con el medio externo así como del mantenimiento de la homeostasis iónica controlando la absorción de iones a nivel del plasmalema y su compartimentación intracelular (endosomas y vacuolas). Es necesario el secuestro de ROS y proteger estructuras celulares sensibles; y todo ello requiere de un apropiado y coordinado sistema de transducción de la señal de estrés, en la que una serie de moléculas o segundos mensajeros deben regular la actividad de las proteínas efectoras implicadas en el transporte iónico, en el mantenimiento del turgor y/o en la detoxificación de ROS, así como la expresión de los genes que las codifican (Chinnusamy et al., 2005; Vinocur y Altman, 2005; Figura A3).

##### **A4.1 Mantenimiento del equilibrio osmótico.**

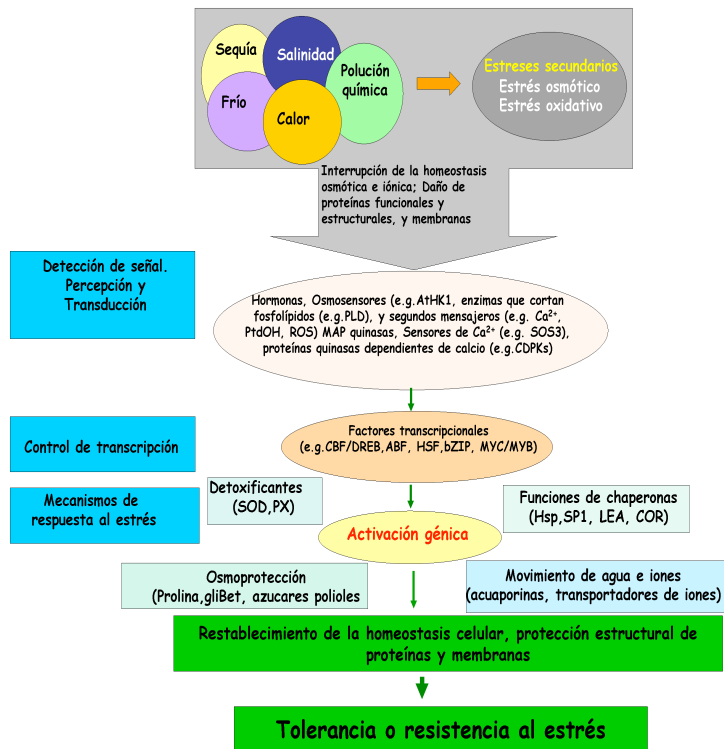
El estrés osmótico reduce inmediatamente la expansión celular en el ápice de la raíz y en las hojas jóvenes, y causa el cierre estomático. Las células vegetales expuestas a un medio salino pueden equilibrar su potencial hídrico reteniendo agua, mediante un efecto de dilución que mitiga el exceso de iones (Romero-Aranda et al., 2006) o bien perdiéndola, lo que provoca una disminución del potencial osmótico y de la turgencia. Esta situación genera señales intracelulares, como síntesis de ABA (ácido abscísico) o aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático libre, que desencadenan posteriores respuestas adaptativas (Hasegawa et al., 2000).

En líneas generales, las plantas llevan a cabo el ajuste osmótico acumulando iones o sintetizando solutos orgánicos compatibles con el metabolismo de la célula (Yeo, 1998; Nuccio et al., 1999; Hasegawa et al., 2000; Huang et al., 2000; Rathinasabapathi, 2000; Heidari y Mesri, 2008). La acumulación de estos solutos compatibles en respuesta al estrés salino es una adaptación metabólica útil para el

equilibrio osmótico entre la vacuola y el citosol (Yancey et al., 1982; Rhodes y Hanson, 1993). Los solutos compatibles comprenden una amplia gama de compuestos orgánicos: monosacáridos (fructosa y glucosa), alcoholes (glicerol, inositoles metilados), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa y fructanos), polioles, aminoácidos y compuestos de amonio cuaternario (prolina, glicina betaína, alanina betaína o prolina betaína) (Rhodes y Hanson, 1993; Nuccio et al., 1999; Heidari y Mesri, 2008). Como los solutos compatibles son hidrofílicos, pueden sustituir al agua en la superficie de las proteínas y membranas, lo que explica su acción como osmoprotectores y como chaperonas de bajo peso molecular (Hasegawa et al., 2000). En muchas plantas halófitas, la prolina o la glicina betaína se almacenan en grandes cantidades en las vacuolas de las hojas. En glicófitas, los solutos compatibles se acumulan a concentraciones no superiores a 10 mM, pero sólo en el citoplasma, contribuyendo de forma significativa al mantenimiento de la presión osmótica (Rhodes et al., 2002). Aunque la síntesis de estos compuestos permite a la planta sobrevivir en presencia de altas concentraciones externas de sal, al requerir energía, se produce a expensas del crecimiento de la planta.

También se han relacionado algunos tipos de proteínas con la tolerancia a la salinidad. Se trata de proteínas sintetizadas bajo condiciones de estrés salino, como osmotinas, dehidrinas, proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant*) y poliaminas, principalmente putrescina y espermina (Tester y Davenport, 2003; Groppa y Benavides, 2008; Alcázar et al., 2010; Gill y Tuteja, 2010; Janicka-Russak et al., 2010). Se desconoce en gran medida la función de osmotinas y dehidrinas en la tolerancia a la salinidad (Rorat, 2006; Saavedra et al., 2006; Brini et al., 2007; Battaglia et al., 2008; Goel et al., 2010). De manera general, se ha propuesto que el papel de estos compuestos estaría relacionado con el mantenimiento de la estructura de proteínas (Campbell y Close, 1997; Battaglia et al., 2008; Bies-Etheve et al., 2008). Las proteínas LEA se acumulan en los tejidos vegetativos de todas las especies vegetales en respuesta al estrés osmótico causado por sequía, salinidad o

frío (Xiong y Zhu, 2002; Dalal et al., 2009). Estas proteínas probablemente contribuyen a la preservación de la integridad estructural de la célula (Winicov, 1998), actuando como chaperonas para prevenir la desnaturalización de otras proteínas (Xiong y Zhu, 2002; Goyal et al., 2005; Grelet et al., 2005; Reyes et al., 2005; Liu et al., 2010). Por la importancia de los flujos hídricos en los procesos de ajuste osmótico celular, la actividad de las acuaporinas también tendría un papel clave entre los mecanismos de adaptación al estrés osmótico (Maurel y Chrispeels, 2001; Vera-Estrella et al., 2004). Las acuaporinas facilitan la toma de agua desde el medio y determinan la conductividad hidráulica de la raíz en respuesta a numerosos estreses ambientales (Luu y Maurel, 2005; Maurel et al., 2008). La exposición de raíces a la salinidad induce cambios de la expresión de acuaporinas a múltiples niveles. Estos cambios incluyen una disminución coordinada a nivel transcripcional y una nueva localización subcelular de las proteínas PIPs (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*) de la membrana plasmática y TIPs (*Tonoplast Intrinsic Proteins*) de tonoplasto. Estos mecanismos pueden actuar en concierto para regular el transporte de agua desde la raíz, sobre todo a largo plazo (Boursiac et al., 2005; Forrest y Bhave, 2007; Katsuhara y Hanba, 2008).



**Figura A3.** 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. Estas señales de estrés son detectadas por sistemas sensores o de percepción, transmitidas intracelularmente y convertidas en una respuesta consistente en la activación de proteínas efectoras o en la inducción de la expresión de los genes que las codifican. Esta respuesta conlleva finalmente el restablecimiento de la homeostasis celular y, en consecuencia, la tolerancia al estrés. Modificado de Vinocur y Altman (2005).

#### A4.2 Mantenimiento de la homeostasis iónica.

Las plantas pueden poner en marcha varios tipos de respuestas adaptativas frente al componente iónico de la salinidad. Por un lado, un mecanismo de evitación, mediante el desarrollo de funciones y estructuras celulares que protegen de dichas condiciones; y por otro lado, un mecanismo de tolerancia mediante el cual las células adaptan sus funciones a las altas concentraciones intracelulares de sales. Para ello, se requiere una coordinación precisa entre los mecanismos celulares y los que operan a nivel intercelular, en tejidos y órganos.



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), 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. Desde aquí, los iones y el agua pueden ser 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 y forzando la entrada a través del plasmalema de las células de la estela, vía simplasto.

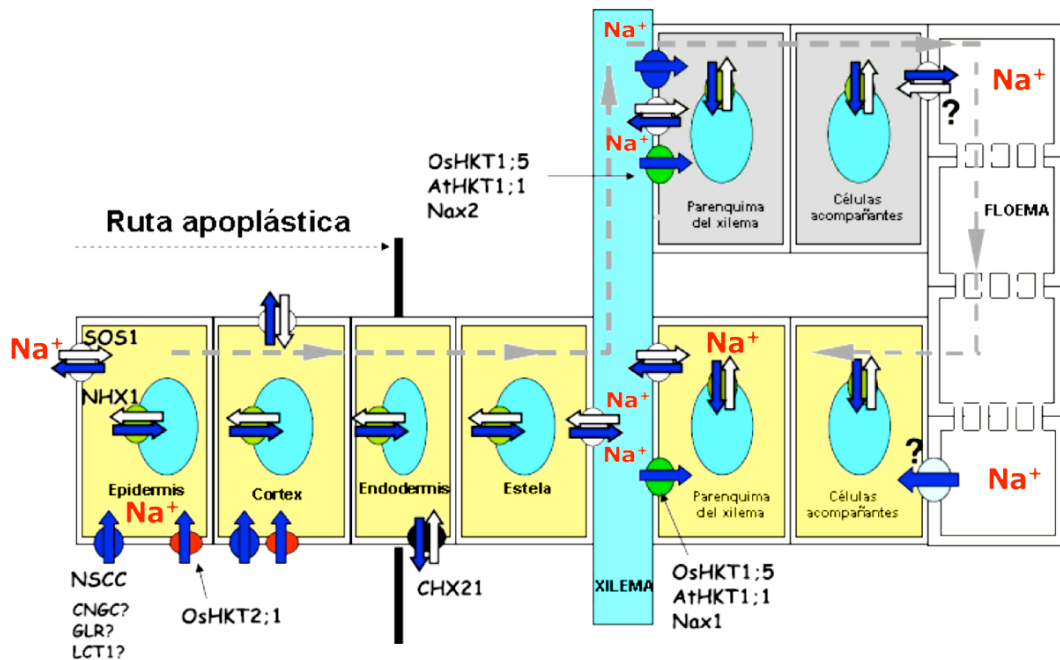
En el contexto de la planta entera, la toxicidad al  $\text{Na}^+$  se ha asociado con su grado de acumulación en la parte aérea (hojas) en plantas glicófitas. Para evitar esta acumulación, las plantas glicófitas han desarrollado una estrategia de exclusión de iones a nivel de la raíz (Tester y Davenport, 2003; Yeo, 2007). La capacidad de exclusión de  $\text{Na}^+$  viene dada por el control del flujo neto de absorción de  $\text{Na}^+$ , 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. Este control conduce a una acumulación de  $\text{Na}^+$  en las vacuolas de las raíces o en las células proximales del tallo evitando así su acumulación en las hojas (Apse y Blumwald, 2007). Una segunda estrategia, propia de plantas glicófitas tolerantes y halófitas, descansa en la capacidad de distribución del  $\text{Na}^+$  en los tejidos vegetales, esencialmente hacia el tallo y las hojas. Esta estrategia 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 (Apse y Blumwald, 2007, Munns y Tester, 2008; Figura A4).

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  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  provoca la alteración de la absorción y, por tanto, del contenido de otros iones, particularmente  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Tester y Davenport, 2003), resultando de especial importancia en la tolerancia a la sal, el mantenimiento de una alta selectividad para el  $\text{K}^+$  frente al  $\text{Na}^+$  (Greenway y Munns, 1980; Shannon et al., 1994; Maathuis y Amtmann, 1999; Maathuis, 2009). El control de la selectividad  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  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 (Munns, 2002) (Figura A4). Otro punto de control de la selectividad  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  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  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en partes aéreas, la liberación preferente de  $\text{K}^+$  en el xilema o la reabsorción de  $\text{Na}^+$  de la savia xilemática, conduce a una mayor selectividad  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ . Concretamente, en legumbres, existe un mecanismo de exclusión de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea basado en el intercambio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en las células parenquimáticas del xilema, con apariencia de células de transferencia, a nivel de las partes proximales del tallo y de la raíz (Läuchli y Epstein, 1990). Este mecanismo de exclusión de  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  en determinadas zonas de la hoja, o en hojas maduras o lo recirculan en dirección a las raíces (Jeschke, 1984; Tester y Davenport, 2003; Figura A4).



**Figura A4.** Esquema general de transporte de  $\text{Na}^+$  a nivel de la planta entera mostrando los diferentes transportadores de  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  entra en el simplasto de la raíz, vía NSCC, y probablemente, otros transportadores. Se mantiene una baja concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  por la acción de los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática y vacuolar, SOS1 y NHX1, respectivamente. El antiportador catión/ $\text{H}^+$  de tipo CHX (CHX21) contribuye al movimiento de  $\text{Na}^+$  desde las células endodérmicas al apoplasto de la estela. En la estela, el  $\text{Na}^+$  es cargado en el xilema por el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática, SOS1 en la raíz, el  $\text{Na}^+$  puede ser descargado del xilema en la raíz, vía uniportadores selectivos (AtHKT1;1, OsHKT1;5, Nax1). En las hojas, el  $\text{Na}^+$  puede ser descargado por uniportadores selectivos (AtHKT1;1, OsHKT1;5, Nax2) y NSCC. En las hojas, se mantiene una baja concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  por la acción de los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática y vacuolar, tipo SOS1 y NHX1, respectivamente. El mecanismo de carga y descarga floemática y la recirculación de  $\text{Na}^+$  vía floema están por determinar. Modificado de Apse y Blumwald (2007).

### **A5. Transportadores implicados en la homeostasis de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.**

Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto clave de la toxicidad por Na<sup>+</sup> es su competición por los sistemas de absorción de K<sup>+</sup>, lo que resulta en una deficiencia nutricional de K<sup>+</sup> y una perturbación del potencial osmótico de la célula. Teniendo en cuenta que el K<sup>+</sup> participa como cofactor en numerosas reacciones enzimáticas y está implicado en la síntesis de proteínas (Marschner, 1995), un desequilibrio en los niveles de K<sup>+</sup> puede perturbar de forma severa el metabolismo a nivel de la raíz y de la parte aérea en la planta. De ahí que no sea la cantidad absoluta de Na<sup>+</sup> *per se*, sino la relación citosólica K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> la que determine la competencia metabólica y, en definitiva, la capacidad de la planta para sobrevivir en presencia de un estrés salino (Niu et al., 1995; Maathuis y Amtmann, 1999; Shabala, 2000; Mäser et al., 2002a; Tester y Davenport, 2003; Apse y Blumwald, 2007; Chen et al., 2007a; Gierth y Mäser, 2007; Shabala y Cuin, 2008; Maathuis, 2009; Yao et al., 2010). A menudo, dicho concepto se confunde con la razón K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> del tejido (parte aérea u hoja), lo cual resulta erróneo, puesto que es la homeostasis citosólica de K<sup>+</sup> y no su contenido vacuolar, la que resulta esencial en los procesos metabólicos (Maathuis y Amtmann, 1999; Shabala y Cuin, 2008).

Las evidencias recientes obtenidas en plantas modelo como *Arabidopsis* y arroz, han conducido a la idea actualmente preponderante de que la homeostasis del K<sup>+</sup> a nivel de planta entera bajo condiciones salinas tiene lugar, no sólo por la acción de transportadores específicos de K<sup>+</sup>, sino también en una gran medida, por medio de la regulación de las concentraciones de Na<sup>+</sup> en los diferentes tejidos. Diversos transportadores de Na<sup>+</sup> controlan la razón K<sup>+</sup> / Na<sup>+</sup>, mediante la extrusión de Na<sup>+</sup> al medio externo, su compartimentación vacuolar, así como la carga y descarga xilemática (Zhu et al., 1998a; Tester y Davenport, 2003; Horie y Schroeder, 2004; Rus et al., 2005; Ren et al., 2005; Sunarpi et al., 2005; Apse y Blumwald, 2007, Rodríguez-Rosales et al., 2009). Además, el mantenimiento de la razón K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> también depende del control de la pérdida de K<sup>+</sup> celular que provoca el estrés salino

(Shabala y Cuin, 2008). En la Tabla A3 se enumeran los transportadores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  principalmente implicados en evitar la acumulación excesiva de  $\text{Na}^+$  en el citosol o la pérdida de  $\text{K}^+$  de la célula. En los siguientes apartados de esta Memoria se realiza una revisión más detallada del papel de dichos transportadores, especialmente las proteínas NHX y SOS en el control de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

**Tabla A3.** Transportadores y canales iónicos que previenen la acumulación excesiva de  $\text{Na}^+$  o la pérdida de  $\text{K}^+$  (alta razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ) en el citosol. Entre paréntesis, bomba primaria que energiza el transporte secundario de iones.

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

### A5.1. Entrada de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ .

En condiciones fisiológicas, las plantas mantienen una alta razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en su citosol con una concentración de  $\text{K}^+$  en torno a 100-200 mM y una concentración de  $\text{Na}^+$  entre 1 y 10 mM (Higinbotham, 1973; Tester y Davenport, 2003). Considerando la diferencia de potencial eléctrico en la membrana celular (-140 mV) (Higinbotham, 1973), una subida de la concentración de  $\text{Na}^+$  extracelular establecerá un gran gradiente de potencial electroquímico de  $\text{Na}^+$  que favorecerá el transporte pasivo de este ión desde el medio al citosol, a través de sistemas uniporte o canales.

Se han propuesto tres rutas para la absorción del  $\text{Na}^+$  por la planta (Tester y Davenport, 2003). Una primera ruta, no mediada por transportadores y denominada flujo de desvío, se atribuye a la filtración a través del apoplasto debida a la

discontinuidad en la endodermis. 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 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  $\text{Na}^+$  (Yadav et al., 1996; Yeo et al., 1999). En trigo, la entrada de  $\text{Na}^+$  a través del apoplasto es 10 veces menor que en arroz (García et al., 1997). En plantas de *Arabidopsis* cultivadas a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , todas las rutas de entrada de  $\text{Na}^+$  contribuyen en la misma medida (Essah et al., 2003); mientras que en plantas halófitas existen gran número de adaptaciones anatómicas para reducir al mínimo la entrada apoplástica de sal. En este sentido, la anchura de la banda de Caspari es de dos a tres veces mayor en halófitos que en glicófitos (Poljakoff-Mayber, 1975), y la capa interior de células corticales puede diferenciarse en una segunda endodermis (Stelzer y Läuchli, 1977).

Las otras dos rutas son de tipo simplástico y están mediadas por canales y transportadores que pueden ser sensibles o insensibles a los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Es conocido que la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio externo generalmente reduce los efectos tóxicos del  $\text{Na}^+$  (Shabala et al., 2000; Cramer, 2002). Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  puede actuar como segundo mensajero, respondiendo a cambios del potencial de membrana relacionados con las fluctuaciones del  $\text{Na}^+$  extracelular y del  $\text{K}^+$  intracelular (Tracy et al., 2008; Kader y Lindberg, 2010).

La identidad molecular de los transportadores implicados en las vías de entrada masiva de  $\text{Na}^+$  es todavía materia de debate (Yeo, 2007; Apse y Blumwald, 2007; Munns y Tester, 2008). Existen evidencias bioquímicas y electrofisiológicas que indican que el  $\text{Na}^+$  entra en la célula a través de canales no selectivos sensibles a

$\text{Ca}^{2+}$  (Demidchik et al., 2002; Demidchik y Tester, 2002; Horie y Schroeder, 2004; Demidchik y Maathuis, 2007). Estos sistemas incluyen los canales catiónicos no selectivos (NSCC, *Non Selective Cation Channels*) y los transportadores LCT1 (*Low affinity Cation Transporter 1*). En las bases de datos hay varios genes candidatos que podrían codificar canales NSCC, entre ellos, los CNGCs (*Cyclic Nucleotide-Gated Channels*) (Leng et al., 2002; Kaplan et al., 2007), y los GLRs (*Glutamate Receptor-like genes*) (Tester y Davenport, 2003; Demidchik et al., 2004; Apse y Blumwald, 2007, Shabala y Cuin, 2008; Figuras A4 y A5).

En el caso de los canales CNGCs, la adición extracelular de análogos de nucleótidos cíclicos produce una inhibición de la actividad del canal y, en consecuencia, de la entrada de  $\text{Na}^+$  (Maathuis y Sanders, 2001). Esta familia de canales está constituida por 20 miembros en *Arabidopsis* (Talke et al., 2003). Estudios electrofisiológicos indican que AtCNGC1 y AtCNGC4 son igualmente permeables a  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , mostrando activación por nucleótidos cíclicos (Leng et al., 2002; Balague et al., 2003). AtCNGC2 parece ser selectivo para el  $\text{K}^+$  (Leng et al., 2002); mientras que AtCNGC10 restaura el transporte de  $\text{K}^+$  en mutantes de *E. coli* y en levaduras deficientes en el transporte de  $\text{K}^+$ , así como en el mutante *akt1-1* de *Arabidopsis*, lo que indica que puede participar en el transporte de  $\text{K}^+$  en raíces (Li et al., 2005). La expresión heteróloga en levadura indica que AtCNGC3 puede transportar  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Gobert et al., 2006). AtCNGC3 principalmente se expresa en las células de córtex y epidermis de raíz (Demidchik y Maathuis, 2007). Por otro lado, el análisis de expresión de OsCNGC1 en variedades tolerantes y sensibles de arroz, indica que en presencia de un estrés salino la especie tolerante disminuye la expresión de OsCNGC1, lo que determina una menor entrada de  $\text{Na}^+$  a través de la raíz en la especie tolerante que en la sensible (Senadheera et al., 2009).

En analogía a la situación en animales, se ha sugerido que las proteínas GLRs exhiben una conductancia iónica ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) inducida por aminoácidos, fundamentalmente glicina y glutamato. Estas proteínas pertenecen a una familia

génica que cuenta con 20 miembros en *Arabidopsis*. Experimentos electrofisiológicos en *Arabidopsis* han puesto de manifiesto la existencia de corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  activadas por glutamato e independientes de voltaje, sugiriendo un papel de los canales GLRs en la entrada de  $\text{Na}^+$  (Apse y Blumwald, 2007). Hasta el momento, sólo existen un par de evidencias experimentales directas de la permeabilidad a  $\text{Na}^+$  en las proteínas GLRs de plantas. AtGLR3;7 es permeable a  $\text{Na}^+$  cuando se expresa en oocitos de *Xenopus* (Roy et al., 2008). Además, el estudio llevado a cabo por Tapken y Hollmann (2008) ha permitido demostrar que los poros de AtGLR1;1 y AtGLR1;4 median en el transporte de  $\text{Na}^+$ .

Por otro lado, LCT1 es un transportador de cationes de baja afinidad, aislado de trigo, que complementa un mutante de levadura deficiente en la toma de  $\text{K}^+$  (Schachtman et al., 1997). Se especula a cerca de su implicación en la entrada de  $\text{Na}^+$  en condiciones de alta salinidad (Maathuis y Amtmann, 1999; Dajic, 2006). En levadura, LCT1 cataliza la entrada de diversos cationes, incluyendo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, la expresión de LCT1 en levadura causa hipersensibilidad al sodio, que se mitiga por adición de altas (20 mM), pero no bajas (2 mM) concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Amtmann et al., 2001). LCT1 puede ser un componente del influjo de  $\text{Na}^+$  sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  en raíces de trigo, ya que no se satura a baja concentración externa de  $\text{Na}^+$  (7 mM), una propiedad atribuida a los canales NSCC (Amtmann et al., 2001). Sin embargo, no se han encontrado proteínas que sean similares a LCT1 en los genomas de *Arabidopsis* o de arroz, indicando que LCT1 puede ser una proteína específica de trigo (Apse y Blumwald, 2007).

Debido a que la inhibición del influjo de  $\text{Na}^+$  por el  $\text{Ca}^{2+}$  no es completa, deben existir otros procesos de entrada de  $\text{Na}^+$  independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, se ha atribuido a un transportador de la subfamilia 2 de HKT, HKT2;1 (Platten et al., 2006; Figura A5) un papel relevante en la entrada de  $\text{Na}^+$  en la planta (Tester y Davenport, 2003, Apse y Blumwald, 2007; Figuras A4 y A5). Los ensayos realizados en sistemas heterólogos (oocitos de *Xenopus* y levaduras) determinaron que a nivel



funcional, los transportadores OsHKT2;1 y OsHKT2;2 de arroz, TaHKT2;1 de trigo y HvHKT2;1 de cebada son permeables a  $K^+$  y  $Na^+$  (Rubio et al., 1995; Gollmack et al., 2002; Haro et al., 2005), pudiéndose detectar en estas condiciones un simporte  $Na^+-K^+$  (Rubio et al., 1995; Haro et al., 2005; Jabnourne et al., 2009). En estos sistemas heterólogos, altas concentraciones externas de  $Na^+$  favorecen el influjo de  $Na^+$ , mientras que altas concentraciones externas de  $K^+$  lo inhiben (Rubio et al., 1995; Gassmann et al., 1996; Horie et al., 2001; Garcíadeblás et al., 2003). Existen sin embargo datos contradictorios que muestran que la expresión de TaHKT2;1 y HvHKT2;1 en estos sistemas heterólogos puede modificar las propiedades de transporte en función del plásmido empleado (Haro et al., 2005).

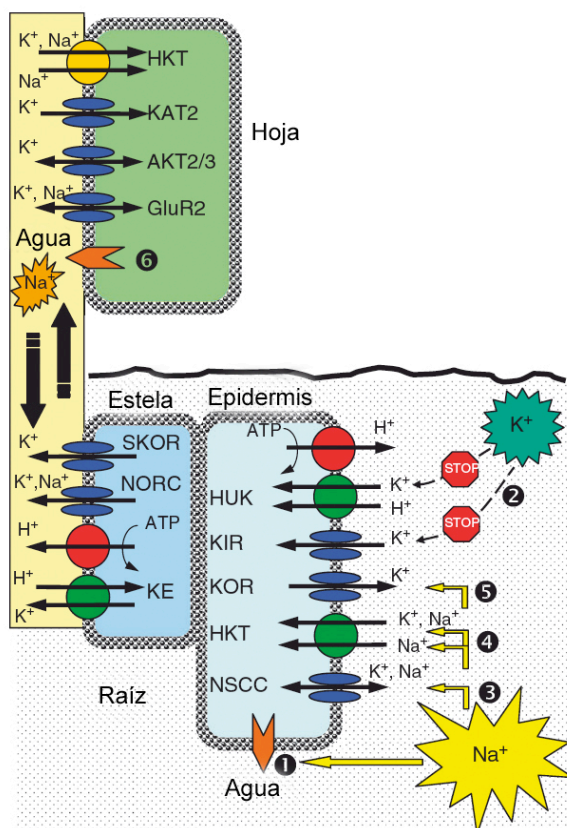
Laurie et al. (2002) mostraron que TaHKT2;1 estaba relacionado con la entrada de  $Na^+$  a la raíz de la planta en presencia de altas concentraciones externas de  $Na^+$  (100-200mM). En este sentido se ha podido localizar OsHKT2;1 y PutHKT2;1, de *Puccinellia tenuiflora*, en el plasmalema de la epidermis y células corticales de la raíz (Horie et al., 2007; Ardie et al., 2009). El papel de estos transportadores en la planta ha sido elucidado gracias a los análisis de expresión y de transporte, de forma que cuando existe un déficit de  $K^+$  en el medio externo se produce un aumento de la expresión de OsHKT2;1 y un aumento de la absorción de  $Na^+$  en las raíces de las plantas. Asimismo, en presencia de concentraciones moderadas de  $Na^+$  se produce una disminución en los niveles de expresión de OsHKT2;1 y en la entrada de  $Na^+$  en las raíces (Horie et al., 2001 y 2007; Garcíadeblás et al., 2003). De acuerdo con todos estos resultados OsHKT2;1 no parece ser la vía masiva de entrada de  $Na^+$ , sino que mas bien, participaría en la absorción de  $Na^+$  de alta afinidad en condiciones de deficiencia en  $K^+$ , de forma que el  $Na^+$  podría sustituir al  $K^+$  en algunas de sus funciones, fundamentalmente osmóticas y a baja salinidad (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Horie et al., 2007).

Existen sin embargo algunos indicios que muestran que no todos los transportadores de la subfamilia 2 de HKT tienen la misma función. La

sobreexpresión en *Arabidopsis* de OsHKT2;1 ha mostrado que este transportador efectivamente interviene en la absorción de Na<sup>+</sup> cuando las concentraciones de K<sup>+</sup> son bajas, mientras que los estudios de sobreexpresión de PutHKT2;1 han mostrado que este transportador interviene en la absorción de Na<sup>+</sup> cuando las concentraciones de K<sup>+</sup> son altas (Ardie et al., 2009). En este sentido, Yao et al. (2010) han observado diferencias en los patrones de selectividad catiónica entre OsHKT2;1 y OsHKT2;2, ya que éste último no muestra la capacidad de absorber Na<sup>+</sup> cuando en el medio existen bajos niveles de K<sup>+</sup>, y además presenta actividad de cotransporte, puesto que el K<sup>+</sup> estimula la captura de Na<sup>+</sup> y el Na<sup>+</sup> estimula la entrada de K<sup>+</sup> (Pardo, 2010).

Algunos transportadores de alta afinidad de K<sup>+</sup> de la familia KUP/HAK/KT parecen tener también capacidad de mediar el transporte de Na<sup>+</sup> de baja afinidad a concentraciones elevadas de Na<sup>+</sup> (Santa-María et al., 1997). Los transportadores de alta afinidad AtHAK5 y AtKUP1 tienen una alta capacidad de discriminar entre K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, aunque disminuyen su actividad de captación de K<sup>+</sup> en presencia de altas concentraciones de Na<sup>+</sup> (Fu y Luan, 1998; Rubio et al., 2000; Martínez-Cordero et al., 2004 y 2005). A este respecto, en plantas glicófitas como *Arabidopsis* y tomate, se ha descrito que AtHAK5 y LeHAK5 aumentan su expresión cuando existen bajas concentraciones extracelulares de K<sup>+</sup> (Nieves-Cordones et al., 2008), siendo LeHAK5 el principal responsable de la captura de K<sup>+</sup> en presencia de concentraciones de K<sup>+</sup> inferiores a 0.01mM (Rubio et al., 2010). Se ha comprobado que estos mismos transportadores disminuyen su expresión en presencia de altas concentraciones de Na<sup>+</sup> (Rubio et al., 2000; Nieves-Cordones et al., 2008 y 2010). En halófitas, como *Thellungiella halophila*, la disminución de la expresión de HAK en presencia de Na<sup>+</sup> es menos acusada (Alemán et al., 2009), mientras que en *Mesembryanthemum crystallinum* el Na<sup>+</sup> produce un aumento de la expresión de las proteínas McHAK1 y McHAK2 (Su et al., 2002). También se ha observado que los niveles de transcritos de KUP2 disminuyen en la parte aérea de plantas tratadas con NaCl (Maathuis, 2006).

Se ha descrito que algunos canales de tipo *Shaker* (Bertl et al., 1997), como el canal de tipo KIR (*K<sup>+</sup> Inward-Rectifying channel*), AtAKT1, son la causa de la disminución de la absorción de  $K^+$  inducido por elevadas concentraciones de  $Na^+$  (Qi y Spalding, 2004; Nieves-Cordones et al., 2010; Rubio et al., 2010), debido a que la despolarización de la membrana causada por las altas concentraciones externas de  $Na^+$  hace el transporte pasivo de  $K^+$  termodinámicamente imposible (Shabala et al., 2005; Figura A5).



**Figura A5.** Efectos negativos de la salinidad sobre la homeostasis de  $K^+$  y las relaciones iónicas en plantas. Niveles elevados de  $Na^+$  en la solución del suelo inducen 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 (6). La salinidad reduce sustancialmente la disponibilidad de  $K^+$  por las raíces como resultado de la baja actividad de  $K^+$  en la solución del suelo (2). El  $Na^+$  compete con el  $K^+$  por sus sitios de absorción en la membrana plasmática incluyendo 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 KOR (5). Modificado de Shabala y Cuin (2008).

### A5.2. Extrusión o compartimentación activa de Na<sup>+</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, en presencia de niveles elevados de Na<sup>+</sup> fuera de la raíz o de la célula, el gradiente electroquímico hace que la toma de Na<sup>+</sup> sea pasiva y que el eflujo de Na<sup>+</sup> sea un proceso activo. Mientras la extrusión de sodio en hongos y animales se realiza de forma muy eficaz a través de Na<sup>+</sup>-ATPasas y ATPasas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, respectivamente, estas bombas están ausentes en plantas superiores (Horie y Schroeder, 2004), si bien se han descrito Na<sup>+</sup>-ATPasas en el musgo *Physcomitrella patens* (Benito y Rodríguez-Navarro, 2003). Ello sugiere que este mecanismo de extrusión de Na<sup>+</sup> se ha perdido durante la evolución en las plantas terrestres, las cuales se han desarrollado en medios poco salinos y a bajas concentraciones de K<sup>+</sup> (Benito y Rodríguez-Navarro, 2003). En plantas, la exclusión de Na<sup>+</sup> del citoplasma se realiza por un proceso de transporte activo secundario, mediado por sistemas antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> localizados en la membrana plasmática o en las membranas intracelulares (vacuolar/endosomal). Aunque existían numerosas evidencias bioquímicas de la presencia de sistemas de antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en estas membranas, la identificación de genes que codifican posibles antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> es relativamente reciente y se ha producido fundamentalmente una vez secuenciado el genoma de *Arabidopsis* (Apse y Blumwald, 2007).

Una vez completa la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* se ha identificado un total de 42 genes que codifican proteínas que forman parte de la familia de antiportadores catión/protón (CPA, *Cation Proton Antiporters*) (Saier 1999, Mäser et al., 2001; Sze et al., 2004). En *Arabidopsis* se han identificado cuatro subfamilias de antiportadores catión/protón (CaCA, NhaD, CPA1 y CPA2), que intercambian Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> por H<sup>+</sup> (Mäser et al., 2001). La familia CaCA está formada por once miembros que parecen estar relacionados con el transporte de iones divalentes, como Ca<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> (Cheng et al., 2002). La familia NhaD cuenta con tan sólo dos miembros, aún no caracterizados. Algunos aspectos de su función se tratarán en el apartado A8. Las proteínas de las subfamilias CPA1 y CPA2

contienen un dominio de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00999>). La subfamilia CPA1 está constituida por las proteínas tipo NHX (6) y SOS (2), y la CPA2 por transportadores de tipo CHX (28) y KEA (6). La actividad de los transportadores KEA de plantas ha sido muy poco estudiada. Recientemente, investigadores del laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo de Tesis Doctoral han puesto de manifiesto, mediante estudios de expresión heteróloga en levadura, que los genes AtKEA, más próximos por homología de secuencia a Kha1p y AtCHX20 de la familia CPA2, podrían ser homólogos funcionales de los genes NHX de la familia CPA1 (Aranda, 2010). Estos estudios también han evidenciado que los transportadores AtKEA1 y AtKEA2 podrían funcionar como antiportadores  $\text{K}^+/\text{H}^+$  en vacuolas o prevacuolas, contribuyendo de esta forma a la acumulación vacuolar de cationes (Aranda, 2010). Los transportadores de la familia CHX, NHX y SOS están implicados en el transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y  $\text{K}^+$  en plasmalema, tonoplasto, compartimentos endosomales y cloroplastos, y juegan papeles esenciales en la homeostasis intracelular de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$  (Wu et al., 1996; Bressan et al., 1998; Darley et al., 2000; Shi et al., 2000; Quintero et al., 2002; Shi et al., 2002; Venema et al., 2002; Apse et al., 2003; Venema et al. 2003; Cellier et al., 2004; Qiu et al., 2004; Sze et al., 2004; Brett et al., 2005b; Leidi et al., 2005; Shabala et al., 2005; Hall et al., 2006; Maresova y Sychrova, 2006; Apse y Blumwald, 2007; Padmanaban et al., 2007; Rodríguez-Rosales et al., 2008; Rodríguez-Rosales et al., 2009; Zhao et al., 2008; Olías et al., 2009a y 2009b, Leidi et al., 2010).

#### **A5.2.1. Eflujo de $\text{Na}^+$ .**

El control del eflujo de  $\text{Na}^+$  parece ser más importante que el influjo en la regulación del transporte neto de  $\text{Na}^+$  en glicófitas (Tester y Davenport, 2003; Yeo, 2007), de manera que parece establecerse un ciclo fútil de  $\text{Na}^+$  a nivel de la membrana plasmática de las células epidérmicas y corticales de la raíz (Malagoli et al., 2008).

La extrusión de  $\text{Na}^+$  en plantas superiores está dirigida por un sistema antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Blumwald et al., 2000; Shi et al., 2000; Pardo et al., 2006), acoplado al gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  generado por la  $\text{P-H}^+$ -ATPasa (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  $\text{Na}^+$  (P-ATPasas), inexistentes en plantas superiores (Benito et al., 2002; Benito y Rodríguez-Navarro, 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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en plasmalema de raíces. A este respecto, se ha identificado en *Arabidopsis* un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  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  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  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  $\text{Na}^+$  (Quintero et al., 2002; Zhu, 2002). Además de participar en la extrusión de  $\text{Na}^+$  al medio externo, los genes de la ruta SOS juegan un papel esencial en la regulación de la homeostasis del  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  y el desarrollo de la planta. Puesto que el estudio de estos genes es objetivo fundamental de este trabajo de Tesis Doctoral, cada uno de los componentes de la ruta SOS será revisado con mayor detalle en un apartado independiente (apartado A7).

### A5.2.2. Compartimentación vacuolar de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

Tanto en plantas halófitas como en glicófitas tolerantes existe una clara correlación entre compartimentación iónica 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<sup>+</sup> sea dirigido a la parte aérea, vía xilema (transporte de Na<sup>+</sup> a larga distancia) (Yeo, 2007; Figura A4 y A5). La inclusión de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en la vacuola, constituye, por tanto, otro de los mecanismos importantes del mantenimiento de la alta razón K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> citosólica. Dicho proceso se lleva a cabo por la acción de sistemas antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que están acoplados a un gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> generado por la acción de la V-ATPasa y V-PPasa de tonoplasto (Ballesteros et al., 1996 y 1997; Kerkeb, 2000; Blumwald et al., 2000; Gaxiola et al., 2001; Rodríguez-Rosales et al., 2009).

La identidad molecular de dichos antiportadores se ha atribuido a las proteínas de las familias NHX y CHX, que se localizan en membranas endosomales o vacuolares (Apse et al., 1999; Hamada et al., 2001; Venema et al., 2002; Xia et al., 2002; Yokoi et al., 2002b; Venema et al., 2003; Fukuda et al., 2004b; Ohnishi et al., 2005; Vasekina et al., 2005; Vera-Estrella et al., 2005; Yoshida et al., 2005; Hall et al., 2006; Li et al., 2006a; Maresova y Sychrova, 2006; Pardo et al., 2006; Padmanaban et al., 2007; Rodríguez-Rosales et al., 2008; Zhao et al., 2008; Rodríguez-Rosales et al., 2009). Cellier et al., (2004) sugirieron que al menos un miembro de familia CPA2, AtCHX17, puede contribuir a la adquisición de K<sup>+</sup> y a su homeostasis bajo condiciones salinas, ya que los niveles de transcrito de este gen aumentan en dichas condiciones (Maathuis, 2006). Igualmente se ha demostrado que el transportador AtCHX20 complementa la sensibilidad a la deficiencia de K<sup>+</sup> a pH alcalino provocada por la disrupción del transportador intracelular ScKHA1 en

levadura (Padmanaban et al., 2007). En *Arabidopsis*, AtCHX20 estaría implicado en la osmoregulación y posiblemente en la regulación del pH en endosomas de células guarda (Padmanaban et al., 2007). Por último, se ha demostrado que el transportador AtCHX23 que se localiza en cloroplastos, estaría implicado en la regulación del pH citoplasmático y posiblemente en el mantenimiento de un pH elevado en el estroma del cloroplasto, necesario para la síntesis de ATP (Padmanaban et al., 2007).

Se ha sugerido que los principales antiportadores implicados en la acumulación de  $\text{Na}^+$  en vacuolas son las proteínas de la familia NHX. Sin embargo, se ha demostrado también que algunos transportadores NHX están claramente implicados en la regulación del pH vacuolar (Fukada-Tanaka et al., 2000), y que al menos algunos miembros de esta familia tienen una localización endosomal, y catalizan un intercambio  $\text{K}^+/\text{H}^+$  (Venema et al., 2003, Rodríguez-Rosales et al., 2008). Recientemente se ha demostrado que el incremento en la tolerancia a la salinidad de plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan el antiportador vacuolar de *Arabidopsis* AtNHX1, está fundamentalmente asociado al control de la homeostasis del  $\text{K}^+$  (Leidi et al., 2010).

Puesto que el estudio de los transportadores NHX es también objetivo fundamental de este trabajo de Tesis Doctoral, la familia de proteínas NHX será revisada con mayor detalle en un apartado independiente (apartado A6).

### **A5.3. Transporte de $\text{Na}^+$ a larga distancia.**

Como se ha mencionado anteriormente, además de SOS1, los transportadores de tipo HKT juegan un importante papel en el control de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de su participación en el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Pardo et al., 2006). Mientras que en dicotiledóneas, como *Arabidopsis* se ha 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 (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 subdivide 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  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Platten et al., 2006).

Los miembros de la subfamilia 1 tienen un residuo de serina que es reemplazado por glicina en los de la subfamilia 2, si bien su papel en la selectividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  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  $\text{Na}^+$  de baja afinidad que se localizan en la membrana plasmática de las células parenquimáticas que cargan al xilema donde retiran  $\text{Na}^+$  de la savia xilemática previniendo su acumulación en la parte aérea (Figura A4) (Ren et al., 2005; Rus et al., 2005; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Munns y Tester, 2008; Huang et al., 2008). La subfamilia 2 sólo incluye hasta la fecha miembros de gramíneas y tiene como representante tipo a HKT2;1 de arroz, cebada y trigo. HKT2;1 es un transportador de  $\text{Na}^+$  de alta afinidad, inhibible por  $\text{K}^+$ , ubicado en las células epidérmicas y corticales de la raíz y que parece ser el responsable en gran medida de la entrada de  $\text{Na}^+$  en condiciones de deficiencia de  $\text{K}^+$ . Sin embargo, también existen indicios de un posible papel en la absorción de  $\text{Na}^+$  a alta afinidad cuando hay un medio suficiente en  $\text{K}^+$  e incluso algunos presentan capacidad de cotransporte  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  (Horie et al., 2007; Ardie et al., 2009; Yao et al., 2010) (ver apartado A5.1).

AtHKT1;1, único miembro de esta familia en *Arabidopsis* (Uozumi et al., 2000; Mäser 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  $\text{Na}^+$  en raíz/parte aérea, reduciendo su acumulación en hojas (Mäser et al., 2002a). El fenotipo de las líneas mutantes de *AtHKT1;1* (*athkt1*) se caracteriza por una alta sensibilidad a la sal asociada a una mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea y una menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en raíces (Rus et al., 2004; Sunarpi et al., 2005). Aunque 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), este transportador no participa en la absorción de  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  vía floemática (Berthomieu et al., 2003; Figura A5), la función más aceptada de *AtHKT1;1* es la del control de la velocidad de transporte de  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  del xilema e, indirectamente, en la regulación de la homeostasis de  $\text{K}^+$  (Ren et al., 2005).

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 (*Quantitative Trait Loci*) de halotolerancia relacionados con la homeostasis de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  en la parte aérea. La identificación de un gen que codifica a un transportador de  $\text{Na}^+$  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  $\text{K}^+$  sobre la de  $\text{Na}^+$  en una variedad tolerante de arroz (Ren et al., 2005). *OsHKT1;5* es un transportador específico de  $\text{Na}^+$  que resultó ser más activo en la variedad tolerante que en la sensible, correlacionándose con una menor acumulación de  $\text{Na}^+$  a la vez que una mayor de  $\text{K}^+$  en la parte aérea. Se demostró que

la causa de su mayor actividad no era una mayor expresión génica en la variedad tolerante, sino variaciones en algunos aminoácidos (concretamente 4) en la secuencia codificante del alelo tolerante, que le procuraba una mayor eficacia en la descarga de  $\text{Na}^+$  del xilema, e indirectamente, una mejora en la razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de la parte aérea.

Se han identificado en trigo duro dos *loci*, *Nax1* y *Nax2*, ambos determinantes de una menor acumulación de  $\text{Na}^+$  y subsiguientemente, una mayor razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en las hojas (Figura A4) (James et al., 2006). *Nax2* funciona en raíces reduciendo el transporte de  $\text{Na}^+$  desde la raíz a la parte aérea, mientras que *Nax1* mejora la retención en la vaina, restringiendo la cantidad de  $\text{Na}^+$  que llega a la hoja. El mapeo de alta resolución de la región del locus *Nax1* identificó el gen *TmHKT7-A1* (*TmHKT1;4-A1*), que fue polimórfico entre las líneas tolerantes a la sal y las sensibles y cosegregó con *Nax1* (Huang et al., 2006; Horie et al., 2009). El gen *TmHKT1;5* podría ser el candidato del locus *Nax2*, no encontrándose variación alélica alguna, sino su ausencia o presencia entre las líneas tolerantes y sensibles a la sal (Byrt et al., 2007). Por el contrario, en dos ecotipos de *Arabidopsis* tolerantes a la salinidad, se correlacionó los bajos niveles de expresión de un alelo de *AtHKT1* en raíces (Rus et al., 2006) con una mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea, debido a la incapacidad de retirar  $\text{Na}^+$  del xilema. Por tanto, este rasgo se asociaba con una mejor tolerancia a la sal en estos ecotipos.

El antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , *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  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  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).

En tomate, líneas suprimidas de SOS1 revelaron que este transportador participaba en el mecanismo de tolerancia a la salinidad, no solo evitando la entrada masiva de  $Na^+$  por las raíces a través de su actividad extractora de  $Na^+$  al medio, sino también jugando un papel esencial en la distribución de  $Na^+$  en los órganos vegetales y en la capacidad de las plantas de tomate de retener  $Na^+$  en tejidos como el tallo, previniendo así que el  $Na^+$  alcance los tejidos en desarrollo (Olías et al., 2009a). A este respecto, se ha propuesto que la función de transporte de SOS1 en tomate debe de estar estrechamente coordinada con la de HKT1 para el control de la homeostasis de  $Na^+$  y  $K^+$  (Olías et al., 2009b), como se había sugerido previamente en *Arabidopsis* (Pardo et al., 2006). Así, SISOS1 podría mediar la transferencia del  $Na^+$  desde el parénquima xilemático al xilema, preferencialmente en las raíces, mientras que otro transportador, SIHKT1, podría mediar el flujo inverso (por ejemplo, la descarga de  $Na^+$  del xilema en las partes proximales del tallo). La acción coordinada de ambos determinaría en último término la cantidad de  $Na^+$  que deja las raíces, la que se retiene en el tallo o la que se transfiere a las hojas. También SISOS1 podría contribuir en la exclusión de  $Na^+$  desde el citosol de las hojas jóvenes hacia el apoplasto, evitando la acumulación intracelular de  $Na^+$  en células con un sistema vacuolar escasamente desarrollado. Mientras que SIHKT1 podría actuar predominantemente en hojas expandidas o maduras, cuyas células presentan un sistema vacuolar bien desarrollado, que puede acumular  $Na^+$  retirado por HKT1 del

xilema o del apoplasto. Resultados previos obtenidos en relación a AtCBL10 (SCaBP8), un homólogo de AtSOS3 encajan en esta hipótesis. AtCBL10, a diferencia de SOS3, específica de raíces, se expresa solo en la parte aérea y parece estar también implicado en la tolerancia a la sal regulando la acumulación de  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  en las células del mesófilo de las hojas (Quan et al., 2007; Luan, 2009; Luan et al., 2009; Figura A4).

### **A6. Transportadores NHX.**

El primer miembro de la familia NHX identificado en plantas fue AtNHX1 (Gaxiola et al., 1999), que mostró homología con los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE de membrana plasmática de células animales y ScNHX1 de levadura. Se ha demostrado que la expresión de AtNHX1 en levadura complementa la sensibilidad a NaCl causada por la disrupción del gen ScNHX1 (Gaxiola et al., 1999; Quintero et al., 2000). Brett et al. (2005a) propusieron la agrupación de las proteínas NHE6 y NHE7 humanas, ScNHX de levadura y AtNHX1 de *Arabidopsis* en una nueva subfamilia NHE de antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  intracelulares. Posteriormente, se han identificado muchos más antiportadores intracelulares, ahora llamados NHX, en plantas, hongos y animales.

En plantas se han descrito varias isoformas de transportadores NHX. En *Arabidopsis* se han descrito 6 miembros, AtNHX1 a AtNHX6, y en tomate, se identificaron 4 miembros, denominados LeNHX1, LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4 (Venema et al., 2003; Gálvez, 2009). LeNHX2 ha resultado ser el primer antiportador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  endosomal descrito en plantas (Venema et al., 2003; Rodríguez-Rosales et al., 2008).

Las proteínas NHX están divididas en dos clases: Clase-I y Clase-II (Pardo et al., 2006), con aproximadamente 20 a 25 % de identidad entre ellas (Brett et al., 2005a). Las secuencias de Clase-I son muy divergentes de otras secuencias NHX y hasta ahora han sido identificadas en monocotiledóneas y dicotiledóneas tanto angiospermas como gimnospermas, así como en el musgo *Physcomitrella patens*. También se han encontrado secuencias relacionadas con las secuencias de Clase I, aunque de forma muy lejana, en algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Osteococcus lucimarinus* y *Osteococcus tauri*, lo que podría indicar una especialización de los antiportadores de Clase-I en plantas terrestres. Una característica común a las isoformas NHX de la Clase-I hasta ahora estudiadas es su localización en la membrana vacuolar. La única excepción a la localización vacuolar de estos transportadores fue encontrada por Vera-Estrella et al. (2005), quienes detectaron una proteína de 50 kDa reconocida por un anticuerpo policlonal frente a AtNHX1 en membrana plasmática, pero no en tonoplasto de raíces de *Thellungiella*. Las isoformas de *Arabidopsis*, AtNHX1 a 4, y las isoformas de tomate LeNHX3 y 4 pertenecen a esta clase (Brett et al., 2005a, Gálvez, 2009).

Las secuencias de la Clase-II se pueden encontrar en angiospermas y en la gimnosperma *Picea sitchensis* con miembros ligeramente más distantes en el musgo *Physcomitrella*. Las secuencias Clase II de plantas superiores y musgos presentan bastantes divergencias con las secuencias homólogas en las algas verdes *Ostreococcus lucimarinus* y *Chlamydomonas reinhardtii*. Los antiportadores Clase II estudiados hasta ahora tienen en común su ubicación en compartimentos endosomales. Las isoformas de *Arabidopsis*, AtNHX5 y 6, así como la isoforma LeNHX2 de tomate pertenecen a esta clase (Brett et al., 2005a; Venema et al., 2003).

La mayor parte de las isoformas se expresan en ausencia de estrés en todos los tejidos de la planta (Quintero et al., 2000; Hamada et al., 2001; Fukuda et al., 2004b; Yokoi et al., 2002b; Wu et al., 2004; Zahran et al., 2007; Rodríguez-Rosales et al., 2008, Zhang et al., 2008; Gálvez, 2009; Rodríguez-Rosales et al., 2009) y se

inducen por estrés salino en hojas (Quintero et al., 2000; Venema et al., 2003; Kagami y Suzuki, 2005), en raíces y hojas (Fukuda et al., 1999; Hamada et al., 2001; Brini et al., 2005; Zahran et al., 2007), en tallos (Chauhan et al., 2000) o en raíces (Fukuda et al., 2004b; Zörb et al., 2004). Algunas isoformas son inducidas por ABA (Yokoi et al., 2002b; Venema et al., 2003, Li et al., 2009), KCl (Fukuda et al., 1999; Gaxiola et al., 1999; Fukuda et al., 2004b; Wu et al., 2004), deshidratación (Li et al., 2006a), estrés hiperosmótico (Fukuda et al., 1999; Yokoi et al., 2002b; Fukuda et al., 2004b) o estrés por altas temperaturas (Porat et al., 2002).

Los estudios de expresión realizados en *Arabidopsis* han determinado que existe una expresión preferencial de algunas isoformas de los genes NHX. En este sentido, AtNHX1 y AtNHX2 son las isoformas predominantes encontradas en raíces y parte aérea (Yokoi et al., 2002b; Shi et al., 2002; Apse et al., 2003), siendo los niveles de expresión del resto de isoformas muy inferiores. Además, la expresión de AtNHX1 se incrementa en hojas, pero no en raíces, por tratamiento con NaCl o ABA (Quintero et al., 2000). En plántulas, AtNHX1 y AtNHX2 se inducen además de por estrés salino, por choque hiperosmótico y tratamiento con ABA; mientras que AtNHX5 se induce sólo por estrés salino (Blumwald et al., 2000) y AtNHX4 por estrés salino y ABA (Li et al., 2009). AtNHX1 y AtNHX2 no son inducibles por NaCl en mutantes *aba2-1*, lo que indica que la inducción por NaCl de estos transportadores es dependiente de la señalización por ABA (Shi et al., 2002, Yokoi et al., 2002b). Los estudios de expresión génica basados en la información obtenida de *microarrays* confirman la inducción por estrés salino y osmótico de los antiportadores AtNHX1, 2 y 4 en hojas y AtNHX3 en raíces (Hanana et al., 2007; Winter et al., 2007).

El análisis de expresión del gen GUS bajo control del promotor de AtNHX1 en plantas de *Arabidopsis* transgénicas (Shi et al., 2002) y los estudios de hibridación *in situ* (Apse et al., 2003) mostraron que AtNHX1 se expresaba en todos los tejidos excepto en el ápice de la raíz, y presentaba altos niveles de expresión en células

guarda, en tejidos florales y en células estrechamente asociadas al tejido vascular en hojas e inflorescencias (Shi et al., 2002; Apse et al., 2003).

El análisis de expresión de los genes LeNHX en tomate mostró que la isoforma LeNHX2 se expresaba de forma similar en raíces, tallos, hojas, flor y fruto de plantas de tomate; mientras que LeNHX3 mostraba una expresión diferencial en tejidos vegetativos y LeNHX4 se expresaba sobre todo en flor y fruto (Gálvez, 2009). El efecto del estrés salino sobre los niveles de expresión de los genes LeNHXs ha sido estudiado en la especie silvestre tolerante a la salinidad *Solanum pimpinelifolium* y en la especie cultivada sensible *Solanum lycopersicum* cv. volvogradski, observándose que mientras que los niveles de expresión eran similares en ambas especies en ausencia de estrés, los tratamientos salinos inducían un incremento en la expresión de las isoformas LeNHX3 y LeNHX4, especialmente en la especie tolerante (Gálvez, 2009). Este incremento en la expresión de LeNHX3 y 4 es consistente con el mayor contenido en Na<sup>+</sup> en plantas de la especie tolerante respecto de la sensible cuando ambas se cultivan en condiciones salinas, lo que indica que los transportadores NHX son importantes determinantes de la tolerancia a la salinidad en tomate (Gálvez, 2009).

La expresión preferencial de distintas isoformas NHXs en ciertos tejidos podría estar relacionada con una función específica. Así, la proteína InNHX1 de *Ipomea nil*, se localiza principalmente en el limbo de las flores donde determina el color por cambios en el pH vacuolar (Ohnishi et al., 2005) y la proteína VvNHX1 de uva se localiza fundamentalmente en fruto maduro donde se supone está implicada en la acumulación de K<sup>+</sup> y la expansión de la vacuola durante la maduración (Hanana et al., 2007).



## **A6.1. Función de los antiportadores NHX.**

### **A6.1.1. Tolerancia a la salinidad.**

El papel de los antiportadores NHX en la acumulación de iones y la tolerancia a la salinidad se ha estudiado mediante sobreexpresión y silenciamiento de estos genes, o mediante comparación de sus niveles de expresión y contenido iónico en especies relacionadas que difieren en la tolerancia a la salinidad. En este contexto, comparando *Melilotus indicus*, una planta halófito que crece a 400 mM NaCl, con la especie glicófito relacionada *Medicago intertexta*, se encontró que la especie halofítica acumulaba mucho menos Na<sup>+</sup> y mantenía niveles más altos de K<sup>+</sup> que la glicófito cuando ambas se cultivaban en condiciones salinas. La acumulación de Na<sup>+</sup> y la inducción de la expresión de NHXs en respuesta al estrés salino se encontró sólo en la especie glicofítica, lo que relaciona la inducción de NHXs con el fenotipo de acumulación de Na<sup>+</sup> de la planta más sensible a la salinidad (Zahran et al., 2007). También comparando variedades de maíz que se diferencian en la tolerancia a la sal, se observó que únicamente en una variedad conocida por excluir Na<sup>+</sup> de la parte aérea, la salinidad aumentaba el nivel de transcritos de NHX en las raíces (Zörb et al., 2004). Asimismo, se observó que HvNHX1 era inducido mayoritariamente en raíces de cebada, monocotiledónea relativamente tolerante a sal, mientras en el arroz, la inducción de OsNHX1 era sobre todo observada en parte aérea, lo que sugiere que la alta tolerancia al NaCl en la cebada está relacionada con la acumulación de Na<sup>+</sup> en vacuolas de las células de la raíz para limitar el transporte a la parte aérea (Fukuda et al., 2004a, 2004b). Sin embargo, esta conclusión podría ser precipitada ya que el patrón de expresión de otras isoformas de cebada no ha sido estudiado y puede ocurrir que la isoforma estudiada presente un patrón de inducción específico de raíz. Algo similar puede ocurrir en arroz donde la isoforma estudiada presenta un patrón de inducción específico de parte aérea.

En tomate, también existe un comportamiento diferencial entre especies con diferente tolerancia a la salinidad en lo que respecta a la expresión de transportadores NHX. Se ha demostrado que en condiciones de estrés salino la especie de tomate silvestre tolerante a la salinidad, *Solanum pimpinelifolium*, acumula más  $\text{Na}^+$  en el tallo y en raíz, manteniendo altos los niveles de  $\text{K}^+$  en estos tejidos, mientras que la especie cultivada y sensible, *S. lycopersicum* cv. Volgogradsky, tiende a acumular más  $\text{K}^+$  en el tallo. En ambas especies, las isoformas LeNHX estudiadas se inducen por estrés salino con un patrón similar en la especie sensible y en la tolerante, si bien los niveles de inducción son más elevados en la especie tolerante, lo que sugiere la implicación de los transportadores NHX en la mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  en *Solanum pimpinelifolium* (Gálvez, 2009).

Se ha observado que mutantes de *Arabidopsis* que no expresan AtNHX1 son más sensibles al estrés salino, aunque no existen datos sobre la acumulación de iones en estos mutantes (Apse et al., 2003). La sobreexpresión de genes NHX ha recibido más atención. Sin embargo, al no tratarse de una expresión específica de tejido o inducible por estrés, es posible que las propiedades reguladoras y la localización celular de los transportadores puedan resultar alteradas bajo condiciones de fuerte sobreexpresión (Yamaguchi et al., 2003, Yamaguchi et al., 2005). Sólo Yang et al., (2009) han observado que la sobreexpresión de AtNHX1 no mejora la tolerancia a la salinidad en plantas de *Arabidopsis* transgénicas. El resto de los trabajos sobre la sobreexpresión de AtNHX1 u otras isoformas NHXs de distintas especies de plantas relaciona estos genes con un incremento de la tolerancia a la salinidad (Apse et al., 1999; Zhang y Blumwald, 2001; Zhang et al., 2001; Ohta et al., 2002; Wu et al., 2004; Xue et al., 2004; He et al., 2005; Li et al., 2006a; Brini et al., 2007; Li et al., 2007; Rajagopal et al., 2007; Verma et al., 2007; Zhao et al., 2007; Chen et al., 2008; Liu et al., 2008; Rodríguez-Rosales et al., 2008; Shi et al., 2008; Zhang et al., 2008; Leidi et al., 2010).

Se ha demostrado que la sobreexpresión en *Arabidopsis* del transportador LeNHX2 de tomate está asociada a una mayor actividad de intercambio  $K^+/H^+$  y  $Na^+/H^+$  en fracciones de endomembranas purificadas a partir de raíces de las plantas transgénicas. Este aumento de actividad es consistente con el mayor contenido de  $K^+$  sin cambios en el de  $Na^+$  que se observa en las plantas transgénicas respecto de las no transformadas cuando ambas crecen en presencia de 50 mM NaCl, así como con el menor crecimiento de las plantas transgénicas respecto a las no transformadas cuando ambas se cultivan en condiciones de deficiencia en  $K^+$  (Rodríguez-Rosales et al., 2008). Resultados similares fueron obtenidos por Leidi et al., (2010) en plantas de tomate que sobreexpresan AtNHX1, lo que sugiere que la mayor tolerancia a la salinidad de las plantas que sobreexpresan LeNHX2 o AtNHX1 está más relacionada con el control de la homeostasis de  $K^+$  que con la compartimentalización del  $Na^+$  (Rodríguez-Rosales et al., 2008; Leidi et al., 2010). Estos resultados explicarían, al menos en parte, porqué la mayor tolerancia a la salinidad no siempre está acompañada de un aumento en la acumulación vacuolar de  $Na^+$ , habiéndose detectado todas las situaciones posibles:  $Na^+$  más alto y  $K^+$  más bajo (Apse et al., 1999; Chen et al., 2008),  $Na^+$  y  $K^+$  más altos (Brini et al., 2007; Zhao et al., 2007; Shi et al., 2008), diferencias sólo marginales (Fukuda et al., 2004b; Li et al., 2007) o  $K^+$  más alto y  $Na^+$  más bajo (Kang'ethe et al., 2007; Zhang et al., 2008).

No existe una clara correlación entre la eficacia de los diferentes transportadores NHX en la tolerancia a la salinidad y su inclusión en la Clase-I o la Clase-II o su pertenencia a especies glicófitas o halófitas (Li et al., 2007; Shi et al., 2008; Zhang et al., 2008). Por tanto, las diferencias en la tolerancia a la salinidad serían el resultado de una regulación diferencial de la actividad o expresión de los antiportadores en especies sensibles o tolerantes.

Recientemente Leidi et al. (2010) han reevaluado el papel de AtNHX1 en la tolerancia a la salinidad mediante la sobreexpresión del mismo en tomate. Las conclusiones que derivan de este estudio difieren, al menos en parte, de las

previamente obtenidas por Apse et al., (1999) y Zhang y Blumwald, (2001) en estudios de sobreexpresión AtNHX1 en *Arabidopsis* y tomate. En este sentido, se ha comprobado que la mayor absorción de  $K^+$  y el incremento del *pool* vacuolar del mismo en las líneas de tomate sobreexpresoras de AtNHX1, respecto a las líneas control se producía a expensas del  $K^+$  citoplásmico, y era resultado de la mayor actividad antiporte  $K^+/H^+$  vacuolar en las plantas transgénicas (Leidi et al., 2010). Ello producía, sin embargo, un fenotipo paradójico de deficiencia de  $K^+$ , capaz de inducir una señal de deficiencia de este catión, que estimularía una mayor absorción del mismo por las raíces. De hecho, las plantas de tomate que sobreexpresan AtNHX1 presentan mayores niveles de transcrito de LeHAK5 en raíz que las controles cuando se cultivan en deficiencia de  $K^+$ , lo cual es consistente con su mayor capacidad de absorción de este catión (Leidi et al., 2010). Este fenotipo paradójico de deficiencia en  $K^+$  también se ha observado en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el transportador LeNHX2 de tomate (Rodríguez-Rosales et al., 2008). Todo ello apunta a la necesidad de reexaminar la función de estos y otros antiportadores en la acumulación intracelular de  $Na^+$ , como proceso clave en la tolerancia a la salinidad.

Tomando como base estas observaciones se puede afirmar que el modelo de secuestro de iones en compartimentos intracelulares, que sugiere que la tolerancia a sal mediada por NHX es una consecuencia de la acumulación de  $Na^+$  tóxico dentro de la vacuola, lejos del citosol, es demasiado simple, y que parte de la tolerancia es debida a la acumulación de  $K^+$  o al control de la homeostasis de este catión, aunque el mecanismo exacto permanezca confuso. En condiciones de estrés salino el  $K^+$  se acumula activamente, especialmente en células del mesófilo de la hoja, pudiendo intervenir los antiportadores NHX en tal acumulación de  $K^+$  (Cuin et al., 2002). Todas las evidencias fisiológicas indican que el papel de los antiportadores NHX en la tolerancia a la salinidad está relacionado con el ajuste osmótico por acumulación de iones en la vacuola o en compartimentos endosomales. El hecho de que los genes NHX sean igualmente inducibles por NaCl, KCl o estrés osmótico y de que los

antiportadores NHX de plantas y levaduras confieran resistencia a altas concentraciones de KCl y al estrés hiperosmótico en células de levadura confirma este papel (Gaxiola et al., 1999; Nass y Rao, 1999; Fukuda et al., 2004b).

#### **A6.1.2. Homeostasis de K<sup>+</sup>.**

Además de un papel en el ajuste osmótico por participar en la acumulación de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> en condiciones de estrés salino, el hecho de que estos transportadores de la familia NHX intervengan en la homeostasis de K<sup>+</sup> en condiciones normales de crecimiento (Zhang y Blumwald, 2001; Venema et al., 2002; Venema et al., 2003), sugieren que la principal función de estas proteínas sea la del transporte de K<sup>+</sup>. La mayor parte del K<sup>+</sup> celular está presente en la vacuola donde está implicado en el mantenimiento del turgor y en la expansión celular, mientras que el K<sup>+</sup> citoplasmático tiene funciones tanto osmóticas como bioquímicas. El K<sup>+</sup> es activamente incluido en la vacuola en condiciones de crecimiento normales; sin embargo, es transportado activamente desde la vacuola al citoplasma en situaciones de deficiencia severa de K<sup>+</sup> para mantener las concentraciones citosólicas adecuadas. En estas condiciones se produce una acidificación del citoplasma que podría representar una señal para inducir la toma de K<sup>+</sup> de alta afinidad, o el eflujo de K<sup>+</sup> desde la vacuola (Walker et al., 1996). Una disminución del gradiente de pH entre la vacuola y el citoplasma podría también disminuir la fuerza motriz que utiliza el mecanismo de antiporte K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> para la acumulación de K<sup>+</sup>. Termodinámicamente, la entrada activa de K<sup>+</sup> en la vacuola en condiciones de suficiencia de K<sup>+</sup> puede ser mediada por un antiportador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, pero el eflujo activo requiere un sistema de simporte K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Walker et al., 1996), suponiendo que la vacuola sea más ácida que el citoplasma, una condición que al parecer no siempre se presenta (Yoshida et al., 2005). Como ya se ha mencionado, la sobreexpresión de AtNHX1 en tomate provoca síntomas de deficiencia a pesar del aumento de la toma y del contenido de K<sup>+</sup> (Leidi et al., 2005; Pardo et al., 2006; Leidi et al., 2010). Por otra parte, los mutantes de

*Arabidopsis* que no expresan AtNHX1 tienen menor área foliar y las células epidérmicas tienen un menor tamaño, lo cual está posiblemente relacionado con un déficit vacuolar de  $K^+$ , necesario para la generación de turgor y la expansión celular. En relación con ello se ha observado que estos mutantes exhiben una tasa más baja de toma de  $K^+$  en raíces, así como menor contenido de  $K^+$  en parte aérea (Leidi et al., 2005; Pardo et al., 2006). El alto nivel de expresión de algunas proteínas NHX en células guarda estomáticas también sugiere que estas proteínas son esenciales para la acumulación del  $K^+$  vacuolar y los cambios de turgor rápidos que ocurren en estas células (Shi y Zhu, 2002; Apse et al., 2003; Leidi et al., 2005).

Un análisis de *array* del ADN de mutantes nulos *nhx* mostró una expresión incrementada del sistema de toma de  $K^+$  de alta afinidad KUP7/HAK7, y una expresión disminuida del sistema putativo de transporte de  $K^+$  AtKEA4, lo que indica un papel de AtNHX1 en la homeostasis de potasio (Sottosanto et al., 2004). El alto nivel de expresión de algunas isoformas NHX en conocidos sumideros de  $K^+$  como son frutos o flores, donde el crecimiento es dependiente de la expansión celular, indica un papel de las mismas en la acumulación de  $K^+$  vacuolar. A este respecto, se sugirió que el alto nivel de expresión de la proteína VvNHX1 en uva durante el proceso de maduración estaba relacionado con la acumulación de  $K^+$  vacuolar para dirigir el flujo de agua hacia el fruto y así aumentar el tamaño de la baya (Hanana et al., 2007). También en *Ipomea tricolor*, además del papel en la determinación del pH vacuolar y el color de la flor, se ha sugerido que la inducción simultánea de NHX1, V-ATPasa, V-PPasa y P-ATPasa es necesaria para la acumulación de  $K^+$  con el objeto de reducir el potencial hídrico y conducir la expansión celular durante la floración (Yoshida et al., 2005).

### A6.1.3. Regulación del pH celular.

La homeostasis del pH citoplasmático es esencial para la función celular. En plantas el pH citoplasmático viene determinado por la acción de bombas primarias de protones y procesos metabólicos que producen  $H^+$  u  $OH^-$ . En este sentido, los antiportadores catión/protón permiten un rápido ajuste del pH citoplasmático (Sakano, 1998). Distintos tipos de estreses, tanto bióticos como abióticos, afectan al pH citoplasmático, pudiendo representar estos cambios la base de muchas rutas de señalización implicadas en las respuestas al estrés, procesos de desarrollo, control hormonal de movimientos estomáticos, respuesta gravitrópica y crecimiento y elongación (Frohnmeier et al., 1998; MacRobbie, 1998; Roos, 2000; Netting, 2002; Viehweger et al., 2002; Zhao et al., 2005).

La participación de los genes NHX de plantas en la regulación del pH vacuolar se ha demostrado claramente al haberse comprobado que el cambio en color de las flores de *Ipomea tricolor* cv Heavenly Blue de rojo violáceo a azul, es causado por un aumento de pH vacuolar de 6.6 a 7.7 durante la apertura de la flor, ya que el pH determina el color de las antocianinas vacuolares (Fukada-Tanaka et al., 2000; Yoshida et al., 2005). Se ha descrito en *Ipomea Nil*, especie emparentada con *Ipomea tricolor*, que una mutación en un gen NHX conlleva la aparición de flores púrpura, debido a la incapacidad de la planta mutante para incrementar el pH vacuolar, condición necesaria para producir pétalos azules (Fukada-Tanaka et al., 2000). El alto pH vacuolar sugiere que las vacuolas son alcalinas respecto al citosol. El desarrollo de tal pH alcalino por un mecanismo de antiporte electroneutro  $K^+/H^+$  requeriría concentraciones más altas de  $K^+$  en el citoplasma que en la vacuola, tal como ocurre en condiciones de agotamiento de  $K^+$  en células corticales y epidérmicas de raíz de cebada (Walker et al., 1996).

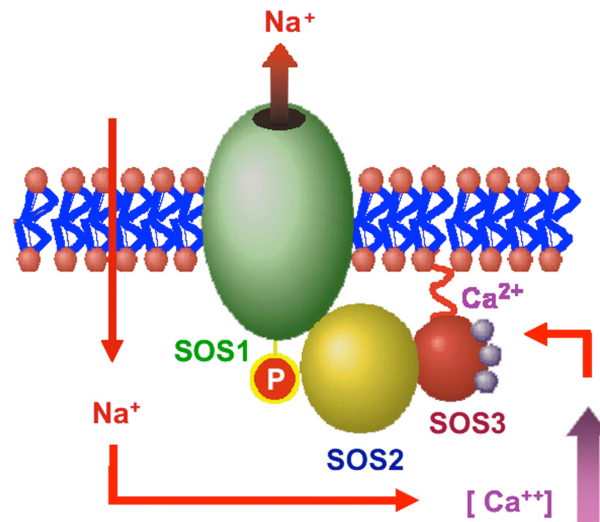
### **A7. Ruta SOS: descripción de sus componentes.**

Como se comentó en el apartado A5.3.1., la identificación de los miembros de la ruta SOS (*salt overly sensitive*-extremadamente sensibles a la sal-) surgió de un cribado de semillas mutadas con varios agentes mutagénicos (Wu et al., 1996). Los mutantes *sos* eran hipersensibles a altos contenidos externos de Na<sup>+</sup> o Li<sup>+</sup> y eran incapaces de crecer a bajas concentraciones de K<sup>+</sup> externo (Zhu, 2002).

En la ruta SOS participan esencialmente las proteínas SOS1, un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> (Zhu, 2002; Shi et al., 2002, Figura A6). 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).

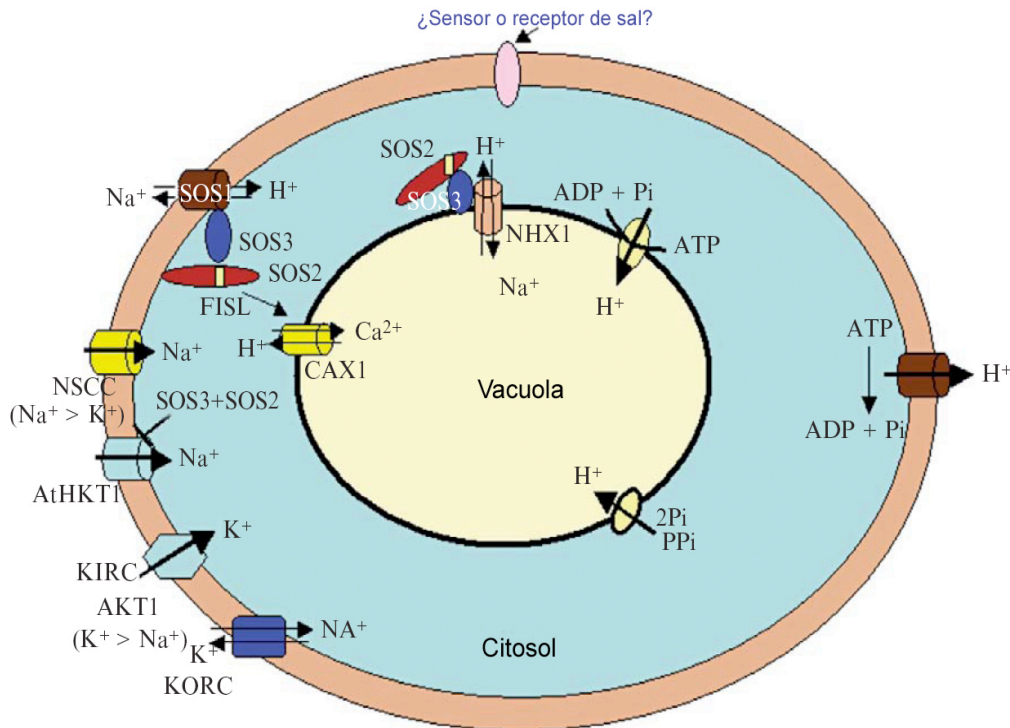
Aunque el mecanismo de señalización del estrés iónico y osmótico no ha sido completamente esclarecido, en *Arabidopsis* se sabe que la respuesta al aumento de Na<sup>+</sup> en el medio de crecimiento de las raíces es un aumento del Ca<sup>2+</sup> citosólico libre (Kiegle et al., 2000; Knight et al., 1997; Knight, 2000; Moore et al., 2002; Tracy et al., 2008), señal que sería detectada por la proteína 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).





**Figura A6.** Representación esquemática del funcionamiento de la ruta SOS. Una alta concentración de sal externa dispara una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol que activa a SOS3, que interacciona específicamente con SOS2. Este complejo SOS2/SOS3 fosforila a SOS1 activando el eflujo de  $\text{Na}^+$  a través del plasmalema. La activación por fosforilación de SOS1 requiere el anclaje a la membrana plasmática del complejo SOS2/SOS3, a través de la miristoilación del extremo 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 transportadores implicados en la compartimentación vacuolar de  $\text{Na}^+$  en condiciones de estrés salino como la  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar, y los antiportadores de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , NHX1 y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , CAX1 (Qiu et al., 2004; Cheng et al., 2004; Batelli et al., 2007; Figura A7).



**Figura A7.** 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 varios transportadores iónicos de las membranas plasmática y vacuolar. Dicho complejo podría regular algunos de transportadores o canales, como KIRC (AKT1), NSCC o KORC, y transportadores como SOS1 en la membrana plasmática, y NHX1, CAX1 y V-ATPasa en la membrana vacuolar. La extrusión de  $\text{Na}^+$  al medio externo por SOS1 es energizada por la  $\text{H}^+$ -ATPasa de la membrana plasmática. Modificado de Tuteja (2007).

### A7.1. SOS1.

El antiportador SOS1 pertenece a la subfamilia NhaP, dentro de la familia de proteínas CPA1, y está relacionado, aunque claramente diferenciado, de los miembros de la subfamilia NHE/NHX (Brett et al., 2005a; Pardo et al., 2006) (apartado A5.3).

El gen *SOS1* fue aislado de *Arabidopsis* mediante clonaje posicional (Shi et al., 2000). 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). En este sentido, los análisis filogenéticos han puesto de manifiesto que SOS1 está relacionado con antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática (Brett et al., 2005a).

Los grupos de los Drs. JM Pardo y JK Zhu lograron reconstituir el sistema SOS de *Arabidopsis* en cepas de levadura hipersensibles a la sal, demostrando que la expresión de AtSOS1 restauraba parcialmente la tolerancia al NaCl, y ello se correlacionaba con un menor contenido intracelular de  $\text{Na}^+$  (Shi et al., 2002; Quintero et al., 2002). Además, la coexpresión de AtSOS2 y AtSOS3 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). Del mismo modo, 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 hipersensible (Quintero et al., 2002). De forma análoga, también se ha logrado reconstituir en levadura los sistemas SOS de arroz (Martínez-Atienza et al., 2007) y tomate (Olías et al., 2009<sup>a</sup>; ElJakaoui, 2009).

En *Arabidopsis* existe un homólogo de AtSOS1, AtNHX8, que parece funcionar como antiportador de plasmalema transportando de forma específica  $\text{Li}^+$  (An et al., 2007). AtSOS1 es un transportador altamente específico para el  $\text{Na}^+$  y parece incapaz de transportar otros cationes monovalentes como  $\text{K}^+$  o  $\text{Li}^+$  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  $\text{K}^+$  a baja afinidad cuando se expresaban en bacterias (Garcíadeblas et al., 2007).

Las medidas de actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de membrana plasmática aisladas de mutantes *sos1* de *Arabidopsis* fue inferior a la de las plantas silvestres (Qiu et al., 2002 y 2003). La adición de SOS2 *in vitro* aumentaba la

capacidad antiportadora al doble comparada 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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en las vesículas de membrana plasmática de raíces (Qiu et al., 2002). Los resultados obtenidos en plantas silenciadas *sos1* de tomate, confirmaron la disminución en la actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en las vesículas de membrana plasmática aisladas, estando esta disminución asociada a una mayor sensibilidad a la salinidad (Olías et al., 2009a).

Los niveles de transcrito de AtSOS1 están positivamente regulados por el estrés salino, pero no por ABA o frío, siendo más abundantes en raíces que en parte aérea (Shi et al., 2000). Los niveles de expresión de AtSOS1 están regulados por los miembros de la ruta SOS. En este sentido, 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* sí que estaba regulada por estrés salino en raíces, aunque no en parte aérea. En hojas de *P. euphratica*, *PeSOS1* mostró el mismo perfil de expresión que en *Arabidopsis* (Wu et al., 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., 2007b), indicando que la ruta SOS no es exclusiva de plantas glicófitas como *Arabidopsis*, sino que es efectivamente funcional en halófitas. En tomate, *SISOS1* se expresó ubicuamente tanto en especies tolerantes como en sensibles, incrementándose fuertemente en todos los tejidos en presencia de un estrés salino, aunque en mayor medida en raíces y hojas (El Jakaoui, 2009, Olías et al., 2009a). Este aumento de la expresión en raíces está de acuerdo con la necesidad de disminuir la absorción neta de  $\text{Na}^+$  a nivel de las células apicales, epidérmicas y corticales de la raíz. Mientras que el incremento observado de la

expresión de *SOS1* en hojas de tomate por el tratamiento salino, es indicativo de la participación de *SOS1* en el eflujo de  $\text{Na}^+$  desde el parénquima xilemático de las hojas que restringe la descarga de  $\text{Na}^+$  en las mismas (Oliás et al., 2009a) y estaría de acuerdo con la capacidad bien conocida de las especies tolerantes y sensibles de acumular  $\text{Na}^+$  en hojas (Cuartero et al., 1992). Si bien las especies de tomate más sensibles a la salinidad acumulan  $\text{Na}^+$  preferencialmente en raíces (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999), las especies tolerantes a la sal regularían mejor el  $\text{Na}^+$  en la parte aérea que las sensibles, con una distribución diferencial en tallos y hojas viejas (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Cuartero et al., 2006), lo que evitaría la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas jóvenes, desprovistas aún de un mecanismo de compartimentación vacuolar (Tester y Davenport, 2003; Yeo, 2007).

Estudios de expresión del promotor de *AtSOS1* fusionado al gen reportero *GUS*, ponen de manifiesto que este transportador se expresa en los tejidos internos que rodean la vasculatura de la planta completa (Shi et al., 2002). 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  $\text{Na}^+$ , la extrusión activa del  $\text{Na}^+$  citoplasmático por *SOS1* sería fundamental para prevenir la acumulación de este ión en el ápice de la raíz (Shi et al., 2002).

La expresión preferencial de *SOS1* en las células parenquimáticas que rodean al xilema sugiere un papel de esta proteína en el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia, ya que el  $\text{Na}^+$  es transportado de la raíz a la parte aérea vía xilema. Este hecho junto a la comprobación de que las plantas mutantes *sos1* acumulan menos  $\text{Na}^+$  que las silvestres en la parte aérea en condiciones de estrés salino moderado, mientras que bajo un estrés severo lo acumulan más, demuestra que *SOS1* está implicado en el

transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia, controlando la carga xilemática del catión, y por tanto, la cantidad que llega a la parte aérea (Shi et al., 2002).

Estudios electrofisiológicos también han mostrado que AtSOS1 estaba implicado en la homeostasis del  $\text{K}^+$  intracelular. Así, mediante el análisis de los flujos netos de  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+$ , se demostró que la mutación de *sos1* afectaba a la homeostasis del  $\text{K}^+$  intracelular incrementando la pérdida de  $\text{K}^+$  a través de los canales de  $\text{K}^+$ , KOR, circunscribiéndose no solo al ápice de la raíz, sino a la raíz completa (Shabala et al., 2005). Dicha mutación afectaba además al transporte de  $\text{H}^+$ , incluso en ausencia de estrés salino. Asimismo, SOS1 podría funcionar también protegiendo el transporte de  $\text{K}^+$  en la membrana plasmática durante el estrés salino (Qi y Spalding, 2004). Estudios electrofisiológicos habían demostrado que la capacidad para tomar  $\text{K}^+$  por las células de la raíz de estos mutantes no se afectaba en condiciones control. Sin embargo, en presencia de un estrés moderado la entrada del  $\text{K}^+$  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  $\text{Na}^+$  afectaba al transporte pasivo de  $\text{K}^+$  a través de los canales AKT1, un canal de tipo KIR (Qi y Spalding, 2004). Efectivamente, si se aumentaba la disponibilidad de  $\text{K}^+$  en el medio se rescataba el fenotipo de crecimiento normal en plantas *sos1*.

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 en las respuestas a otros tipos de estreses. Diferentes tipos de estrés ambiental, incluidos el estrés salino, provocan la acumulación de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (Ashraf, 2009). En este sentido, la proteína RCD1 (*radical-induced cell death*) es un importante regulador transcripcional de respuesta al estrés oxidativo y puede estar implicada en una gran variedad de respuestas al estrés abiótico en plantas (Belles-Boix et al., 2000; Ahlfors et al., 2004). Katiyar-Agarwal et al., (2006) descubrieron que el extremo C-terminal de

SOS1 interactuaba con RCD1 tanto en condiciones de estrés salino como de estrés oxidativo, lo que ponía de manifiesto que RCD1 podría estar implicado en la respuesta a estos dos tipos de estrés. Estudios posteriores han descrito que existe un incremento en la estabilidad del ARNm de *AtSOS1* inducido por sal, y mediado 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 los pasos iniciales de la ruta de transducción común a varios estreses abióticos. Muy recientemente, también se han obtenido nuevas evidencias que corroboran que el papel de SOS1 va todavía más allá de su mera función antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ya que la supresión de SOS1 en el mutante *sos1-1* de *Arabidopsis* afectaba la integridad vacuolar, el tráfico de membrana y la homeostasis del pH en condiciones de estrés salino (Oh et al., 2010).

#### **A7.2. SOS2.**

El gen *SOS2* (*CIPK24*), aislado por clonaje posicional de *Arabidopsis*, demostró ser imprescindible para la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  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.

En *Arabidopsis*, *AtSOS2* codifica a una serina/treonina proteína quinasa 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 (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; Luan et al., 2009).

Tanto en experimentos en levaduras como *in vitro* se ha demostrado que SOS2 interactúa físicamente con SOS3 (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 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  $\text{Ca}^{2+}$  resulta en la exposición de una zona hidrofóbica que sería la que podría interactuar con SOS2, de manera que dicha interacción libera el dominio autoinhibitorio, permitiendo el acceso al dominio quinasa de la proteína sustrato, en este caso SOS1, y por tanto, su activación por fosforilación (Guo et al., 2001 y 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 esta proteína con otras proteínas que intervienen en la respuesta a otros tipos de estreses como ABI2 (*ABsiccic acid-Insensitive 2*), de manera que dicha interacción previene la unión de SOS3 a SOS2 y la subsiguiente activación del complejo quinasa (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 (Guo et al., 2001 y 2004).

La importancia de SOS2 se ha revelado no sólo por ser un mediador en la respuesta al estrés salino a través de su interacción con las proteínas de la ruta SOS, sino también en la regulación de otras proteínas de transporte de iones.



Recientemente se ha demostrado la interacción directa de SOS2 con la H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar, así como también existen evidencias de que interactúa con los antiportadores de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, NHX1 y Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>, CAX1 lo que sugiere que SOS2 puede jugar un papel esencial en la tolerancia a la salinidad y adaptación en respuesta al estrés salino (Qiu et al., 2004; Cheng et al., 2004; Batelli et al., 2007; Figura A7).

También se han encontrado puntos de conexión entre SOS2 y la señalización por ROS, concretamente, mediante su interacción con las enzimas nucleósido difosfato kinasa2 (NDPK2) y catalasa, ambas implicadas en la señalización por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Verslues et al., 2007) y en la respuesta al ABA, a través de su interacción con ABI2 (ABA-insensitive 2), una proteína fosfatase de tipo 2C (Ohta et al., 2003).

En tomate, SOS2 se expresó fuertemente y de manera constitutiva en todos los tejidos (en raíz, tallo y hojas) de una especie tolerante silvestre (*S. pimpinellifolium*) afectada o no por estrés salino, mientras que en los tejidos de variedades cultivadas de *S. lycopersicum* únicamente se incrementó la expresión de esta proteína por efecto del estrés salino (El Jakaoui, 2009). Ello indicaría que, a diferencia de las especies cultivadas más sensibles, que deben de inducir su maquinaria de respuesta al estrés, la especie halotolerante se encuentra en una situación de pre-estrés que la prepara para una mejor y rápida respuesta a condiciones de estrés abiótico. Esta hipótesis está apoyada por los resultados surgidos de la comparación a nivel transcriptómico entre *Arabidopsis* y la especie halotolerante relacionada *Thellungiella* en respuesta al estrés salino (Gong et al., 2005).

Además de su implicación en rutas de estrés, SOS2 parece jugar un importante papel funcional en diversos procesos de desarrollo que van desde la germinación hasta la floración. En este sentido, SOS2 fue localizado en el cromosoma 12 de dos poblaciones de líneas recombinantes (RILs -*Recombinant Inbred Line*-), asociado a dos QTLs relacionados con el desarrollo de la hoja y la

floración (Villalta et al., 2008); y más recientemente, se ha puesto de manifiesto su implicación en el fotocontrol de la germinación de semillas de tomate (Auge et al., 2009).

### **A7.3. 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, 1997 y 1998; Guo et al., 2001).

En *Arabidopsis*, la expresión de SOS3 fue específica de raíces, no sufriendo apenas variación por efecto de un estrés salino (Quan et al., 2007; Yang et al., 2009), mientras que en tomate, la expresión también fue específica de raíces, pero disminuyó en presencia de un estrés salino (El Jakaoui, 2009).

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 (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. 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 de localización han demostrado que también AtCBL1 y AtCBL9 se localizan en la membrana plasmática (Xu et al., 2006; Li et al., 2006b; Cheong et al., 2003).

Recientemente se ha descrito que AtCBL10/SCaBP8, defectivo en el motivo de miristoilación en el extremo N-terminal, también recluta a SOS2 a la membrana plasmática para activar a SOS1 en los tejidos de la parte aérea (Lin et al., 2009). En este caso, AtCBL10/SCaBP8, que presenta un largo dominio N-terminal de 25 aminoácidos hidrofóbicos, es fosforilado por SOS2, lo cual parece esencial en la estabilización del complejo AtCBL10/SCaBP8-SOS2 en su unión a la membrana, aunque no es un prerequisite para la misma. Según Kim et al. (2007), la proteína AtCBL10/SCaBP8 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) y Lin et al. (2009) demuestran que esta proteína recluta a SOS2 a la membrana plasmática activando a SOS1 para extruir  $\text{Na}^+$  fuera de la célula, y dicho proceso es dependiente de la fosforilación de AtCBL10/ScaBP8.

La descripción de la estructura cristalina de AtSOS3/AtCBL4 por difracción de Rayos-X (Sánchez-Barrena et al., 2005) y del complejo AtSOS3/AtSOS2 (Sánchez-Barrena et al., 2007), ha permitido descifrar el mecanismo sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la dimerización de SOS3, causando un cambio conformacional que incrementa su carácter hidrofóbico y permite su unión al 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  $\text{Na}^+$  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 en guisante, PsCBL (Mahajan et al., 2006).

## A8. Transportadores NhaD.

Los transportadores de tipo NhaD constituyen un nuevo tipo de antiportadores de plantas que podrían tener una gran importancia en la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$ . Estos transportadores son altamente homólogos a los de halobacterias, caracterizados como antiportadores  $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$  (Mäser et al., 2001). NhaD1 de *Populus euphratica* (PeNhaD1), fue el primer homólogo descrito en plantas superiores de esta familia que ha sido caracterizado parcialmente hasta el momento (Ottow et al. 2005). La caracterización de PeNhaD1 se llevó a cabo mediante estudios de complementación en la cepa mutante EP432 de *Escherichia coli*, la cual es defectiva en los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NhaA y NhaB y, por ello, sensible a la salinidad. Dichos estudios demostraron que PeNhaD1 fue capaz de restaurar el crecimiento de las células EP432 a 400mM NaCl y que la capacidad del transportador para complementar la sensibilidad a sal del mutante era estrictamente dependiente del pH, pues sólo se observó a pH ácido (Ottow et al., 2005). Los niveles de transcrito de PeNhaD1 en ausencia de estrés, fueron similares en una especie tolerante, *P. euphratica* y en la sensible, *Populus x canescens*. Sin embargo, en condiciones salinas, el nivel de expresión se mantuvo en la especie tolerante mientras que disminuyó en la sensible, lo que sugirió un papel relevante de NhaD en la tolerancia a la salinidad (Ottow et al., 2005).

PeNhaD1 fue inicialmente ubicado en la membrana plasmática (Ottow et al., 2005). Estudios posteriores han mostrado que la secuencia codificante de PeNhaD descrita por Ottow et al., (2005) estaba truncada unos pocos cientos de bases en el extremo N-terminal, soslayándose dicha región que contiene el péptido señal dirigido al cloroplasto y que se encuentra en todos los homólogos de eucariotas (Barrero-Gil et al., 2007). Efectivamente, estudios de localización con GFP han demostrado que NhaD1 de *Physcomtrella patens* (PpNhaD1), *Mesembryanthemum crystallinum* (McNhaD), y tomate (Barrero-Gil et al., 2007; Olías et al 2009c; Cosentino et al., 2010) se localizan en la membrana cloroplastidial. SINhaD1 de tomate se ha

localizado además en plastidios de todo tipo de tejidos (amiloplastos, cromoplastos, cloroplastos), lo que sugiere que pueda jugar un papel importante en la homeostasis iónica y control de pH del plastidio en todos los órganos de la planta (Olías et al., 2009c). La entrada de  $\text{Na}^+$  al cloroplasto, mediada por McNhaD, podría estar implicada en el ajuste osmótico cuando la planta está expuesta a un alto estrés salino (Cosentino et al., 2010). En *Arabidopsis*, el análisis de la secuencia genómica predice dos miembros de la subfamilia NhaD (NHD1 y NHD2), aún no caracterizados.

Un problema complejo que todavía no puede ser resuelto debido al desconocimiento del mecanismo de transporte de cationes, es la función concreta de los transportadores NhaD en la membrana del cloroplasto. Se ha propuesto que los transportadores NhaD bacterianos catalizan el intercambio electroneutro  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que media la salida de  $\text{Na}^+$  a valores ácidos de pH y la entrada de  $\text{Na}^+$  a pH 8.0 (Dibrov et al., 2005). Este mecanismo podría explicar la tolerancia al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{Li}^+$  inducida por PeNhaD1 (Ottow et al., 2005) y la tolerancia al  $\text{Li}^+$  inducida por la proteína truncada PpNhaD1-1 que presenta un extremo N-terminal más corto (Barrero-Gil et al., 2007). También se ha observado que las proteínas truncadas PpNhaD1-1 y PpNhaD1-2 suprimen de forma muy efectiva la deficiente absorción de  $\text{K}^+$  del mutante TKW4205 de *E. coli* y que este efecto es más claro a pH alto (Barrero-Gil et al., 2007). Ello parece estar en contraposición con la tolerancia al  $\text{Li}^+$  del mutante EP432 transformado con PpNhaD1-1, que está restringida a valores bajos de pH (Barrero-Gil et al., 2007). No obstante, este efecto dual podría explicarse si consideramos que PpNhaD1 es un intercambiador  $\text{Na}^+ (\text{Li}^+)/\text{K}^+-\text{H}^+$ . Todas estas consideraciones han llevado a proponer que PpNhaD1 podría funcionar como la proteína GerN de *Bacillus cereus* (Thackray et al., 2001), es decir, realizando un intercambio  $1\text{Na}^+/1\text{K}-1\text{H}^+$  o  $1\text{Na}^+/2\text{H}^+$ .

Los escasos estudios existentes hasta el momento en relación a estos transportadores en plantas sí dejan claro que la elucidación de su función fisiológica precisa de estudios más exhaustivos a nivel de cloroplasto, así como la generación de

plantas que sobreexpresen o silencien este transportador en las que además de un análisis de fenotipos se pueda determinar en diferentes condiciones experimentales la actividad de transporte asociada a NhaD. La investigación en este sentido parece importante ya que el control de pH a nivel del cloroplasto resulta esencial (Peters y Berkowitz, 1991) y esta función no puede establecerse de forma independiente a la regulación de los contenidos en  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

Además de NhaD, el único transportador identificado en cloroplasto que puede mediar el transporte de  $\text{H}^+$  y cationes alcalinos es AtCHX23 (Song et al., 2004). A diferencia de NhaD, los transportadores CHX23 están poco conservados. Por ejemplo, la identidad de secuencias entre *Arabidopsis* y arroz para NhaD es del 82 % y para CHX23 es del 41 %. A este respecto, el elevado grado de conservación de los transportadores NhaD sugiere que deben tener un papel fundamental en la función del cloroplasto (Song et al., 2004).

### **A9. El tomate como planta modelo en los estudios de salinidad.**

Los antecedentes expuestos en esta memoria, especialmente los provenientes de la investigación en plantas modelo como *Arabidopsis* y arroz, han conducido a la idea actualmente preponderante de que el mantenimiento de una alta razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  citosólica es el mecanismo clave para la mejora de la tolerancia a la salinidad en las plantas. El mantenimiento de la homeostasis del  $\text{K}^+$  citosólico y la expulsión del  $\text{Na}^+$  al exterior celular o su compartimentación en vacuolas, depende de la actividad de transportadores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , entre ellos, SOS1 y proteínas NHX (Zhu et al., 1998a; Horie y Schroeder, 2004; Rus et al., 2005; Apse y Blumwald, 2007; Rodríguez-Rosales et al., 2009; Leidi et al., 2010). La diferencia en la tolerancia a la salinidad entre glicófitas y halófitas resultaría ser más bien cuantitativa que cualitativa, ya que los mecanismos básicos de tolerancia a salinidad muy probablemente se encuentren conservados en todas las plantas.

Existen dos importantes limitaciones en lo que se refiere al estudio del transporte de  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  en tallo con respecto a las hojas, lo que limita el estudio de importantes factores que controlan la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a nivel de organismo bajo condiciones salinas, como son los procesos de reabsorción de  $\text{Na}^+$  por el tallo y su redistribución en hojas viejas (Tester y Davenport, 2003). 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  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  bajo condiciones salinas en especies hortícolas de interés agronómico (Tester y Bacic, 2005; Davenport et al., 2005 y 2007; Moller y Tester, 2007; Byrt y Munns, 2008). A este respecto, el tomate constituye un excelente modelo de planta de cosecha idónea para estudiar dichos aspectos (Foolad, 2007). En este sentido hay que destacar la gran relevancia económica nacional e internacional del cultivo del tomate, el gran número de estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares de los que ha sido objeto, la posibilidad de ser manipulado genéticamente, y la gran cantidad de información disponible de los proyectos de secuenciación a gran escala con la reciente liberación del borrador de la secuencia completa (*The International Tomato Genome Sequencing Consortium*, [http://solgenomics.net/about/tomato\\_sequencing.pl](http://solgenomics.net/about/tomato_sequencing.pl)). 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 variedades 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  $\text{Na}^+$  que llegan a la parte aérea en función de la intensidad del estrés (Estañ et al., 2005). Todo ello parece implicar al módulo funcional de SOS y a los transportadores NHX en la regulación de todos estos procesos.

El tomate es una de las hortalizas más consumidas debido a que se emplea como producto fresco, donde es muy apreciado en la cocina mediterránea, por su riqueza en antioxidantes, especialmente en licopenos, y por ser una fuente importante de vitaminas y minerales en la dieta. Además, un tomate de tamaño medio proporciona el 57% de la cantidad diaria recomendada (RDA) de vitamina C, 25% RDA de vitamina A, y 8% RDA de hierro, pero con sólo 35 calorías. Además, está muy extendido el empleo de sus procesados industriales como son la salsa de tomate, Ketchup, sopa, puré, zumo, el tomate desecado o en conserva en sus diferentes variantes.

Desde el punto de vista agronómico, el tomate es uno de los cultivos hortícolas más ampliamente distribuido. Según las estadísticas de la Organización de Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas (FAOSTAT), el tomate se cultiva en alrededor de 4,5 millones de hectáreas alrededor del mundo con una producción de 133,3 millones de toneladas, generando ganancias anuales de 30 billones de dólares, con un gran comercio internacional. En términos de comercio internacional, España es actualmente el octavo país productor de tomate y ocupa junto a México el primer puesto como país exportador a nivel internacional (FAOSTAT 2007, <http://faostat.fao.org/>). El tomate se cultiva normalmente en zonas altamente productivas, que en España corresponden 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).

### **A10. Estrategias genéticas para la mejora de la tolerancia a la salinidad.**

Los métodos de mejora clásica se basan en continuos retrocruzamientos de líneas parentales que poseen una característica deseable y posterior selección en la progenie del carácter que se quiera transmitir. A pesar de los considerables avances obtenidos por medio de los métodos de mejora clásica, relacionados fundamentalmente con el aumento del rendimiento y la calidad de los cultivos, durante el siglo XX se ha avanzado relativamente poco en la mejora de la resistencia de los cultivos a los diferentes estreses abióticos, entre ellos el estrés salino. Cabe destacar sólo algunos ejemplos en los que se han llegado a obtener algunos cultivares de alfalfa (Dobrenz et al., 1989;; Al-Doss y Smith, 1998; Dobrenz, 1999; Johnson et al., 2001) y trigo (Ashraf y O'Leary, 1996; Hollington, 2000) tolerantes a la salinidad.

Diversos programas de mejora han intentado aplicar de forma complementaria estrategias tecnológicas y biológicas (Cuartero et al., 2006). Las estrategias biológicas, de especial importancia en la 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, que conduzca a la identificación de rasgos halofíticos y, eventualmente, a su aplicación.

Esta aproximación presenta un grave inconveniente, ya que muchas de las especies cultivadas muestran una baja variabilidad genética en lo que respecta a rasgos de halotolerancia. El empleo de especies silvestres relacionadas, resistentes a la salinidad de forma natural, como fuente de genes, a pesar de estar descrita en la

literatura científica por algunos autores (Ashraf, 1994; Flores, 2004), no ha sido ampliamente aplicado. Esto se debe a que la transferencia de los genes implicados en la tolerancia a la salinidad desde una especie silvestre a una especie doméstica es difícil, requiere de mucho tiempo (10 a 15 años) y gran cantidad de mano de obra. Además, por una parte en esta mejora genética por cruzamientos se puede transferir a la progenie tanto los caracteres deseados como los no deseados y, por otra, la incompatibilidad reproductiva puede limitar la transferencia de alelos favorables desde las fuentes inter-específica e inter-genérica (Ashraf et al., 2008).

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 (Rush y Epstein, 1976; Moyle y Muir, 2010). Alguna de estas especies silvestres, como *Solanum pimpinellifolium* o *Solanum cheesmanii* soportan concentraciones de 150-200 mM NaCl, sin merma aparente en el crecimiento (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999). Estas especies de comportamiento halófito se diferencian de sus parientes sensibles de comportamiento glicófito en unos pocos determinantes de tolerancia, entre ellos los mecanismos responsables del transporte de iones y/o de la síntesis de osmolitos y sus correspondientes rutas reguladoras (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Cuartero et al., 2006).

Un importante abordaje funcional es la investigación sobre el gen o grupo de genes implicados en un QTLs que determinan rasgos de halotolerancia y, particularmente, sobre la asociación entre estos QTLs y genes candidatos de funciones conocidas por abordajes anteriores de genética molecular (Asins, 2002; Yamaguchi y Blumwald, 2005; Salvi y Tuberosa, 2007; Yeo, 2007). Sin embargo, este abordaje presenta una importante limitación, ya que la mayoría de QTLs son dependientes de las condiciones ambientales en que se han caracterizado (Cuartero et al., 2006; Collins et al., 2008). De acuerdo con ello, el reto estaría en determinar los

QTLs que tengan un mayor efecto con independencia del fondo genético particular y en identificar los genes que lo determinan (Mittler y Blumwald, 2010).

La ingeniería genética se postula como una estrategia alternativa a la mejora convencional, no sólo para incrementar la tolerancia al estrés, en el caso de este trabajo el estrés salino, sino también para aumentar la calidad y el rendimiento potencial de muchos cultivos. La ingeniería genética constituye una vía rápida para la mejora de plantas de interés agronómico. La aplicación de las herramientas de genómica funcional, como son la búsqueda de mutantes, la expresión heteróloga, el silenciamiento y la sobreexpresión, para la identificación y caracterización de genes *in planta*, son de gran utilidad para proveer de marcadores moleculares de halotolerancia, paso previo para la mejora mediante transformación genética (McCallum et al., 2000).

Existen numerosos estudios que muestran como la sobreexpresión de un único gen permite obtener plantas, incluido el tomate, resistentes a concentraciones relativamente elevadas de sal. Una de las estrategias más importantes para lograr una mayor tolerancia a la salinidad es ayudar a las plantas a restablecer la homeostasis iónica y osmótica perturbada por el estrés salino (ver apartado A4). En este sentido el aumento de las concentraciones de diversos compuestos orgánicos compatibles ha sido una de las aproximaciones más comúnmente empleadas para obtener plantas transgénicas resistentes a la salinidad (Ashraf y Fooland, 2007; Ashraf y Akram, 2009). Existen multitud de referencias relativas a la obtención de plantas transgénicas con diferente grado de tolerancia a la salinidad mediante la sobreexpresión de proteínas implicadas en la síntesis de diferentes osmoprotectores como la prolina en plantas de arroz, cebada, patata, tabaco y *Arabidopsis* (Kishor et al., 1995; Zhu et al., 1998b; Nanjo et al., 1999; Hong et al., 2000; Sawahel y Hassan, 2002; Su y Wu, 2004; Hmida-Sayari et al., 2005), la glicina-betaina en col, arroz, *Brassica juncea* y *Arabidopsis* (Hayashi et al., 1997 y 1998; Nuccio et al., 1998; Sakamoto et al., 1998; Prasad et al., 2000; Bhattacharya et al., 2004), así como una

serie de azúcares (manitol, trehalosa, myo-inositol y sorbitol) (Tarczynski et al., 1993; Pilon-Smits et al., 1995, 1998, 1999; Thomas et al., 1995; Yang et al., 1996; Shen et al., 1997; Gao et al., 2000; Holmstrom et al., 2000; Zhao et al., 2000; Garg et al., 2002; Abebe et al., 2003; Cortina y Culiñez, 2005; Ge et al., 2008). De forma similar, también se ha incrementado la tolerancia a la salinidad mediante sobreexpresión de poliaminas (Anderson et al., 1998; Kumria y Rajam, 2002; Roy y Wu, 2001; 2002; Waie y Rajam, 2003; Capell et al., 2004; Alcázar et al., 2010), de proteínas LEA (Xu et al., 1996; Brini et al., 2007; Lal et al., 2008) y de osmotinas (Goel et al., 2010).

En relación a la homeostasis iónica, la obtención de plantas tolerantes a la salinidad mediante la sobreexpresión de proteínas con actividad antiportadora sodio/protón, ha sido y sigue siendo una de las opciones más empleadas en multitud de estudios. Este es el caso del antiportador NHX1, uno de los más empleados y que ha permitido la obtención de plantas transgénicas de interés agronómico con una mayor tolerancia al estrés salino. Algunos ejemplos de plantas transgénicas donde se han empleado NHX1 son en tomate (Zhang y Blumwald, 2001; Leidi et al., 2010), alfalfa (An et al., 2008), tabaco (Wang et al., 2004; Wu et al., 2004; Lu et al., 2005; Zhang et al., 2008), trigo (Xue et al., 2004), maíz (Xiao-Yan et al., 2004; Chen et al., 2007b), arroz (Ohta et al., 2002; Fukuda et al., 2004b; Verma et al., 2007), algodón (He et al., 2005) y colza (Zhang et al., 2001). En este sentido, los antiportadores NHX2 (Rodríguez-Rosales et al., 2008), SOS1 (Shi et al., 2003; Yang et al., 2009) y SOD2 (Zhao et al., 2006), han sido caracterizado como buenos candidatos para ser implementados en futuras obtenciones de plantas transgénicas con mayor tolerancia a la salinidad.

En los últimos años han aumentado los estudios centrados en los mecanismos de regulación de estos antiportadores, que incluyen los mecanismos de percepción del estrés y/o que modulan la actividad de los antiportadores. Muchas de estas proteínas ya han presentado un gran potencial biotecnológico como se puede

desprender de los estudios en los que han sido caracterizadas, como son la H<sup>+</sup>-pirofosfata AVP1 en algodón (Pasapula et al., 2010) y alfalfa (Bao et al., 2009), las proteínas sensoras de Ca<sup>2+</sup> CBL4 (Wang et al., 2007), CBL5 (Cheong et al., 2010) y SOS3 (Yang et al., 2009); y algunas proteínas reguladoras como son CPK6 (Xu et al., 2010), CBRLK (Yang et al., 2010); ARP (Uddin et al., 2008), CaBP (Pandey et al., 2002) y SOS2 (Yang et al., 2009). Todas estas proteínas aparecen tabuladas a modo de resumen en la tabla A4.

La ruta de señalización iniciada por el estrés salino parece implicar la acción de factores de transcripción que modifican los niveles de expresión muchas proteínas efectoras. En este sentido, la sobreexpresión de algunos factores de transcripción, como CBF4, SNAC2, ZFP252, ZFP179, ha permitido obtener plantas transgénicas de arroz con mayor tolerancia a la salinidad (Oh et al., 2007a; Hu et al., 2008; Xu et al., 2008a; Sun et al., 2010a). Algo parecido ocurre en tomate, donde la sobreexpresión del factor de transcripción CBF1 y CaKR1, mejora la respuesta frente a un estrés salino (Hsieh et al., 2002a, b; Lee et al., 2003; Seong et al., 2007).

Existen casos en los que la modificación de algunas rutas de señalización para estreses bióticos ha generado plantas más tolerantes al estrés salino, lo que demuestra la interrelación de las diferentes vías de señalización del estrés. Así, la sobreexpresión de la prosistemina, un precursor peptídico implicado en la respuesta al estrés biótico, mejora la tolerancia del tomate frente a un estrés salino leve (Orsini et al., 2009).

El control de la producción de radicales libres también ha sido aplicado a la producción de plantas más tolerantes a la salinidad. Esta estrategia incluye la sobreexpresión de enzimas relacionadas con la detoxificación del estrés oxidativo como son la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa (Roxas et al., 1997; Zhu et al., 1999; Xu et al., 2008b). De esta forma se han generado plantas transgénicas de tabaco, tomate, alfalfa y patata sobreexpresoras de diferentes isoformas de SOD (Perl et al., 1993; Sen

Gupta et al., 1993; McKersie et al., 1996; Van Camp et al., 1996), catalasas y oxidasas (Ahmad et al., 2010), con distintos grados de tolerancia al estrés salino.

A pesar de los avances científicos obtenidos en los últimos 20 años con el empleo de la ingeniería genética para mejorar la tolerancia de las plantas a diferentes estreses como la salinidad, sigue existiendo un gran rechazo social al cultivo de organismos modificados genéticamente, lo que hace que la estrategia clásica de mejora por cruzamientos dirigidos siga siendo una opción mas realista para la mejora vegetal a corto o medio plazo (Ashraf et al., 2008). Sin embargo, es previsible que a largo plazo la mejora vegetal por ingeniería genética esté cada vez mas presente en la Agricultura. Los datos muestran que tras más de una década de empleo de cultivos transgénicos en los Estados Unidos, se están generando beneficios para los agricultores (Stokstad, 2010; Comité sobre el impacto de la biotecnología a nivel económico y de sostenibilidad en la agricultura, Consejo Nacional de Investigación, 2010). La superficie dedicada a los cultivos transgénicos se ha multiplicado por 80 entre 1996 y 2009, dedicándose actualmente unos 134 millones de hectáreas en el mundo. Los cultivos modificados genéticamente alcanzan actualmente 69, 16, 41 y 8 millones de hectáreas dedicadas a la soja, algodón, maíz y colza, respectivamente (Clives, 2009). En la tabla A5 se muestran las especies vegetales transgénicas cultivadas actualmente a escala mundial (Clives, 2009).

<b>Gen</b>	<b>Fuente</b>	<b>Planta modificada</b>	<b>Fenotipo en condiciones de estrés salino</b>	<b>Referencias</b>
LeNHX2 (Antiportador Na <sup>+</sup> (K <sup>+</sup> )/H <sup>+</sup> )	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mejor crecimiento en presencia de NaCl. Mayor actividad antiporte Na <sup>+</sup> (K <sup>+</sup> )/H <sup>+</sup> en endomembranas.	Rodríguez-Rosales et al., (2008)
AtNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Mayor acúmulo de K <sup>+</sup> . Mayor actividad antiporte Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar.	Leidi et al., (2010)
MsNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mejora en la germinación y desarrollo de las plántulas. Mejor ajuste osmótico.	An et al., (2008)
MsNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> (K <sup>+</sup> )/H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	Mejor ajuste osmótico en presencia de NaCl.	An et al. (2008)
AtNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Aeluropus litoralis</i>	Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Mayor producción de biomasa. Acumulación de Na <sup>+</sup> en raíces y mejor relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> en las hojas.	Zhang et al., (2008)
OsNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	Mayor producción de biomasa y de grano. Acumulación de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> .	Chen et al., (2007b)
PgNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Pennisetum glaucum</i> L.	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Aumento del sistema radicular y de la longitud de parte aérea.	Verma et al., (2007)

AtNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Festuca alta ( <i>Festuca arundinacea</i> S.)	Mayor producción de biomasa. Aumento de la actividad antiporte Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar y acumulo de Na <sup>+</sup> en la raíz.	Zhao et al., (2007)
AtNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Festuca alta ( <i>Festuca arundinacea</i> S.)	Mejor crecimiento en 200 mM NaCl.	Tian et al., (2006)
AtNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Mayor producción de biomasa y fibras de mejor calidad.	He et al., (2005)
HbNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Hordeum brevisubulatum</i>	Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Mayor biomasa en las semillas, mayor contenido de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en hojas, mejor relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> y de prolina.	Lu et al., (2005)
OsNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	<i>Lolium perenne</i> L.	Crecimiento a 350 mM NaCl. Mayor acumulación de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y prolina.	Wu et al., (2005)
OsNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	Arroz silvestre ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Mejor crecimiento a 200 mM NaCl. Mayor acumulación de Na <sup>+</sup> y menor de K <sup>+</sup> .	Fukuda et al., (2004b)
GhNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Mayor producción de biomasa. Aumento del contenido de Na <sup>+</sup> vacuolar.	Wu et al., (2004)
AtNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	Mejora en la germinación.	Xiao-Yan et al., (2004)



AtNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Mejora en la germinación, mayor producción de biomasa y de grano. Aumento de K <sup>+</sup> y disminución de Na <sup>+</sup> en las hojas.	Xue et al., (2004)
BnNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	Colza ( <i>Brassica napus</i> L.)	Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Mejor crecimiento y producción de semillas a 200 mM NaCl.	Wang et al., (2004)
AgNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Atriplex gmelini</i>	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Mejora en la germinación. Aumento de la actividad antiporte Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar.	Ohta et al., (2002)
AtNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Mejor crecimiento. Aumento del número de flores y de la producción. Mayor actividad antiporte Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar.	Zhang y Blumwald (2001)
AtNHX1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Colza ( <i>Brassica napus</i> L.)	Mayor producción de biomasa, grano y calidad del aceite en las semillas. Mejora en la germinación y supervivencia de las plantas. Aumento de contenido en prolina y disminución del K <sup>+</sup> citosólico.	Zhang et al., (2001)

AtSOS1, AtSOS2 y AtSOS3 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> , quinasa y sensor de Ca <sup>2+</sup> , respectivamente)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mejora la tolerancia a la salinidad.	Yang et al., (2009)
AtSOS1 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mejora en la germinación y crecimiento de la raíz. Aumento de los niveles de proteínas y clorofila. Menor acumulación de Na <sup>+</sup> en la parte aérea,	Shi et al., (2003)
SOD2 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	Levadura ( <i>Sacharomices pombe</i> )	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Mayor producción de biomasa a 150 mM y 300 mM NaCl. Mayor acumulación de K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup> y menor de Na <sup>+</sup> . Aumento de los niveles de fotosíntesis.	Zhao et al., (2006)
SOD2 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	Levadura ( <i>Sacharomices pombe</i> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mayor producción de biomasa. Menos acumulación de Na <sup>+</sup> y más de K <sup>+</sup> .	Gao et al., (2003)
SOD2 (Antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	Levadura ( <i>Sacharomices pombe</i> )	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mayor producción de biomasa. Menos acumulación de Na <sup>+</sup> y más de K <sup>+</sup> .	Gao et al., (2003)
AtAVP1 (H <sup>+</sup> -pirofosfatasa)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Mejor crecimiento a 200 mM NaCl Mayores producción de fibras..	Pasapula et al., (2010)
AtAVP1 (H <sup>+</sup> -pirofosfatasa)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	Mayor producción de biomasa. Aumento de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> en hojas y raíz	Bao et al., (2009)

AVP1 (H <sup>+</sup> -pirofosfatasa)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mejor crecimiento a 250 mM NaCl. Mayores niveles de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> , y en el contenido relativo de agua en hojas. Aumento del contenido proteico y disminución del potencial osmótico y de la apertura de estomas.	Gaxiola et al., (2001)
AtCBL5 (Proteína sensora)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mayor tolerancia a la salinidad en etapas tempranas del desarrollo.	Cheong et al., (2010)
ZmCBL4 (Proteína sensora)	Maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mayor tolerancia a la salinidad en etapas tempranas del desarrollo. Menor acumulo de Na <sup>+</sup> .	Wang et al., (2007)
AtCPK6 (Proteína reguladora)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mejor ajuste osmótico. Aumento de prolina .	Xu et al., (2010)
GsCBRLK (Proteína reguladora)	Soja ( <i>Glycine max</i> L)	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Mejora la tolerancia a la salinidad.	Yang et al., (2010)
OsARP (Proteína reguladora)	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Aumento de Na <sup>+</sup> en las hojas y menor pérdida de agua.	Uddin et al., (2008)
EhCaBP (Proteína de unión a Ca <sup>2+</sup> )	<i>Entamoeba histolitica</i>	Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Aumento del porcentaje de germinación y mayor producción de biomasa.	Pandey et al., (2002)

**Tabla A5.** Superficie dedicada a nivel mundial a los principales cultivos transgénicos. \* Países con un mínimo de 50000 hectáreas cultivadas (Clives, 2009).

País	Superficie (Mha)	Cultivos biotecnológicos
Estados Unidos*	64	Soja, maíz, algodón, colza, calabaza, papaya, alfalfa, remolacha azucarera
Brasil*	21,4	Soja, maíz, algodón
Argentina*	21,3	Soja, maíz, algodón
India*	8,4	Algodón
Canadá*	8,2	Colza, maíz, soja, remolacha azucarera
China*	3,7	Algodón, tomate, papaya, álamo, pimienta dulce
Paraguay*	2,2	Soja
Sudáfrica*	2,1	Maíz, soja, algodón
Uruguay*	0,8	Soja, maíz
Bolivia*	0,8	Soja
Filipinas*	0,5	Maíz
Australia*	0,2	Algodón, colza
Burkina Faso*	0,1	Algodón
España*	0,1	Maíz
México*	0,1	Algodón, soja
Chile	<0,1	Maíz, soja, colza
Colombia	<0,1	Algodón
Honduras	<0,1	Maíz
Rep. Checa	<0,1	Maíz
Portugal	<0,1	Maíz
Rumania	<0,1	Maíz

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## M1. Material biológico.

### M1.1. Bacterias.

#### M1.1.1. Cepas utilizadas.

Para la transformación de plantas de tomate se usó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (Tabla M1).

Tabla M1. Características de la cepa de *A. tumefaciens* utilizada.

Cepa	Fondo Cromosómico/ Resistencia	Plásmido Ti/ Gen Marcador	Opina	Referencia
LBA4404	TiAch5 / Rifampicina	pAL4404/ Espectinomicina y Estreptomicina	Octopina	Hoeckema et al., (1983)

#### M1.1.2. Cultivo bacteriano.

Las bacterias se cultivaron en diferentes medios líquidos y sólidos, estos últimos obtenidos por adición de 15 g/l de bactoagar a los correspondientes medios líquidos (Tabla M2). La esterilización se realizó mediante autoclavado (Autoclave Selecta mod. Presoclave 75 l) a 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Para la selección de transformantes, los medios de cultivo se suplementaron con distintos antibióticos: Kanamicina (50 µg/ml), Rifampicina (50 µg/ml) y Estreptomicina (30 µg/ml). En todos los casos los antibióticos se prepararon como soluciones concentradas en agua Milli-Q, a excepción de la Rifampicina, que se disolvió en metanol, a una concentración de 10 mg/ml. Todas las soluciones de antibióticos se esterilizaron a través de unidades de filtración de 0,22 µm de poro (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, EE.UU.) y se adicionaron a los medios previamente autoclavados. La manipulación de los cultivos bacterianos se realizó en

una cabina de flujo laminar horizontal (ESCO modelo LHC-4B1) para evitar la contaminación de los mismos.

Para el cultivo en medio líquido, se inoculó una colonia procedente de un cultivo en placa en 3 ml de medio o se inoculó 50 µl de un cultivo madre saturado de *A. tumefaciens* en 5 ml de LB o TYNG (Tabla M2) suplementado con los antibióticos adecuados, en agitación orbital a 225-250 rpm y 28 °C durante dos días. El cultivo se sometió a fuerte agitación para romper los grumos formados por la agregación de células.

**Tabla M2.** Medios utilizados para el cultivo de bacterias.

Medio	Composición
<b>LB</b>	Bacto-triptona 1% (p/v) NaCl 1% (p/v) Extracto de levadura 0,5% (p/v) pH 7,0 con NaOH
<b>TYNG</b>	Bacto-triptona 1% (p/v) Extracto de levadura 0,5% (p/v) NaCl 170 mM MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 0,8 mM pH 7,5 con NaOH

### **M1.1.3. Obtención de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*.**

Se partió de un inóculo de 50 µl de un cultivo madre saturado en 5 ml de TYNG (Tabla M2) suplementado con los antibióticos adecuados, en agitación orbital a 225-250 rpm y 28 °C durante dos días. Se tomó una alícuota de 0,5 ml que se inoculó en 60 ml de TYNG y se cultivó en agitación orbital a 225-250 rpm y 28 °C hasta alcanzar una DO<sub>660</sub> (densidad óptica medida a 660nm) de 0,5-0,6. Se incubó el cultivo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3500 g durante 6 minutos, a 4 °C. El sedimento resultante se resuspendió en 20 ml de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 20 mM, centrifugándose de nuevo a 3500 g durante 6 minutos. El sedimento obtenido se



resuspendió en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 20 mM frío y se almacenó a -80° C en alícuotas de 150 µl conteniendo 15 % (v/v) glicerol.

#### **M1.1.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.**

Se partió de 150 µl de células competentes a las que se añadió al menos 10 µg de DNA plasmídico. Se agitó el conjunto y se congeló en nitrógeno líquido durante 5 minutos. Después de descongelar a temperatura ambiente, se adicionó 1 ml de LB o TYNG y se transfirió el cultivo a tubos estériles de 15 ml, que se incubaron durante toda la noche en agitación orbital a 200 rpm y 28 °C. Al día siguiente se sembró el cultivo en medio TYNG suplementado con los antibióticos de selección y se incubó a 28 °C hasta la visualización de colonias (aproximadamente 3-4 días). La presencia del transgen se confirmó por PCR utilizando los cebadores adecuados (apartado M2.1.1) previa recuperación del plásmido (apartado M2.1.4).

#### **M1.2. Material vegetal.**

Se utilizó tomate (*Solanum lycopersicum* L., cv MicroTom) como material vegetal.

##### **M1.2.1. Esterilización de semillas.**

Las semillas de tomate se desinfectaron mediante inmersión durante 5 minutos en hipoclorito sódico comercial diluido al 50% en agua destilada estéril. Transcurrido este tiempo, las semillas se lavaron tres veces en agua destilada estéril, la primera durante 5 minutos, y las otras dos durante 10 minutos, manteniéndose en agua destilada estéril durante toda la noche a temperatura ambiente. Todo el proceso se realizó bajo agitación.

**M1.2.2. Germinación de semillas *in vitro*.**

Una vez esterilizadas, las semillas de tomate se transfirieron a tubos de ensayo que contenían medio de germinación (GM) compuesto por los macro y micronutrientes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa al 1% (p/v) y agar al 0,8% (p/v), ajustándose el pH a 6,2 con KOH. Después de 2-4 días en oscuridad a 26 °C, los tubos con las semillas germinadas se transfirieron a una cámara de cultivo, donde se incubaron a 24 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, humedad relativa del 40-50 % e iluminación de 140  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Las plántulas se mantuvieron en estas condiciones durante aproximadamente dos semanas, hasta que el primer par de hojas se encontraba expandido. En ese momento se aislaron los cotiledones, que se utilizaron para los experimentos de transformación.

**M1.2.3. Cultivo en suelo.**

Las plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de semillas (apartado M1.2.2.) se transfirieron a semilleros conteniendo una mezcla 1:1 de vermiculita y turba (Compo Sana<sup>®</sup> Universal) y, cuando alcanzaron un porte adecuado, se pasaron a macetas de 3 litros conteniendo el mismo sustrato. Las plantas transferidas a macetas se cultivaron en invernadero hasta la fructificación, desde Septiembre a Junio, bajo irradiación natural, suplementada con luz artificial de 122  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 26/15 °C y 40/55 % de temperatura y humedad relativa, día/noche, respectivamente. Las plantas se regaron 2-3 veces por semana con una dilución 1/2 de solución nutritiva de riego (Tabla M3).

**M1.2.4. Cultivo en sistema hidropónico.**

Las semillas se germinaron en placas Petri sobre un papel de filtro estéril empapado en agua destilada estéril, a 26 °C y en oscuridad hasta que emergía la

radícula (2-4 días), transfiriéndose entonces a cajas de plástico (13x13 cm) que contenían arena de cuarzo estéril a razón de 15 semillas por caja. En estas cajas las semillas se mantuvieron otros 2 días en oscuridad y a 26 °C hasta la emergencia de los cotiledones. Transcurrido dicho periodo, las plántulas se cultivaron a una temperatura de 24 °C/18 °C, día/noche, iluminación de 140  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y humedad relativa del 40-50 %, hasta alcanzar el estado de cuatro hojas, aproximadamente 21 días. Durante la primera semana, las plantas se regaron con una dilución 1/10 de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) y las dos semanas siguientes, con una dilución 1/4 de la misma solución nutritiva. Posteriormente, las plántulas se transfirieron a cubetas de 3 litros con una dilución 1/4 de la misma solución nutritiva (Tabla M3), a razón de 1 plántula por cubeta. Finalmente, las plantas con unos 25 días desde el inicio de la germinación fueron sometidas a los diferentes estreses. Los cultivos hidropónicos estuvieron sometidos a aireación continua y las soluciones nutritivas utilizadas para dichos cultivos se renovaron cada 2-3 días para evitar contaminaciones.

En los ensayos de déficit de  $\text{K}^+$ , se modificó la composición de los macronutrientes según se indica (Tabla 3, macronutrientes -K).

**Tabla M3.** Soluciones nutritivas utilizadas para el cultivo de tomate.

Solución nutritiva para riego	Solución nutritiva para cultivo hidropónico
<b>Macronutrientes(*)</b>	<b>Macronutrientes(*)</b>
(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca·4H <sub>2</sub> O 5 mM	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K 1 mM
KNO <sub>3</sub> 6mM	(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca·4H <sub>2</sub> O 4 mM
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1mM	SO <sub>4</sub> Mg·7H <sub>2</sub> O 1,1 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 2,5 mM	(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Mg·6H <sub>2</sub> O 1,1 mM
	NO <sub>3</sub> K 5,2 mM
	<b>Macronutrientes -K(*)</b>
	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na 1 mM
	(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca·4H <sub>2</sub> O 6,7 mM
	SO <sub>4</sub> Mg·7H <sub>2</sub> O 1,1 mM
	(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Mg·6H <sub>2</sub> O 1,1 mM
<b>Micronutrientes(*)</b>	<b>Micronutrientes(*)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 60 μM	BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub> 46,2 μM
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 20 μM	SO <sub>4</sub> Mn·H <sub>2</sub> O 9,10 μM
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 2 μM	SO <sub>4</sub> Cu·5H <sub>2</sub> O 0,79 μM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 1 μM	Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O 0,05 μM
	SO <sub>4</sub> Zn·7H <sub>2</sub> O 3,10 μM
Fe-EDTA 60 μM	Fe-EDTA 89,6 μM

(\*)La solución de macro- y micro-nutrientes y Fe-EDTA (etilendiaminotetraacetato férrico) se autoclavan y almacenan a 4 °C para evitar contaminaciones.

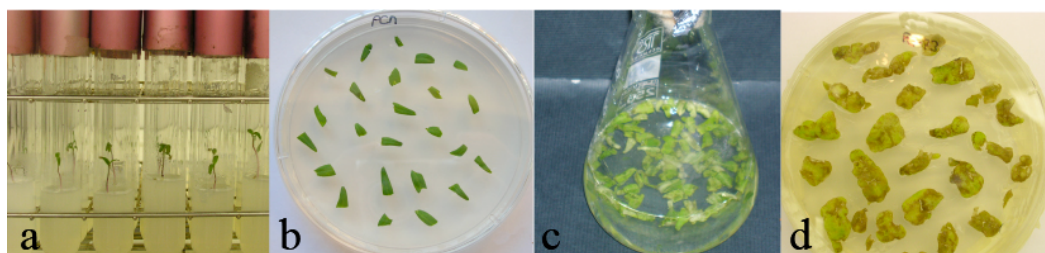
### M1.2.5. Transformación de cotiledones de tomate.

Para la transformación de cotiledones de tomate se siguió básicamente el método descrito por Ellul et al., (2003). Los cotiledones, obtenidos de las plántulas germinadas *in vitro* (apartado M1.2.2.) (Figura M1a), se separaron del resto de la plántula y se seccionaron transversalmente en dos segmentos (Figura M1b). Los segmentos se incubaron en medio de precultivo (PCM) (Tabla M4), situando la parte adaxial del cotiledón en contacto con el medio, y a razón de 24 fragmentos por placa Petri de 9 cm. Después de dos días de precultivo en oscuridad, se llevó a cabo el cocultivo con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* transformada con las construcciones para la sobreexpresión de los genes LeNHX2, SISOS2, SISOS3 y

SINhaD. El cultivo de los segmentos de cotiledón con *A. tumefaciens* (24 segmentos cotiledón/30 ml de cultivo bacteriano) se llevó cabo en medio CCM desprovisto de agar (Tabla M4, Figura M1c) y suplementado con 200  $\mu\text{M}$  de acetosiringona, a fin de favorecer la infección de los cotiledones. El cocultivo se realizó durante 20 minutos, a 26 °C y en agitación orbital a 190 rpm. Trascurrido 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 Petri conteniendo CCM sólido (Tabla M4), donde se incubaron 2 días en oscuridad, a 26 °C. Tras esta incubación se llevó a cabo el lavado de los cotiledones en solución WM (Tabla M4), para eliminar células de *A. tumefaciens*. Después de dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente, los fragmentos de cotiledones se filtraron, se secaron con papel de filtro estéril y se transfirieron primeramente a medio de caulogénesis (SIM-NS y SIM-H) y, posteriormente, a un medio de rizogénesis (RM-H) a fin de regenerar plantas completas (Tabla M4).

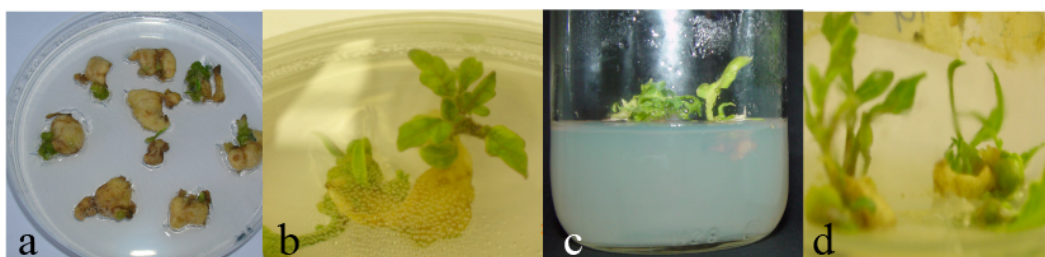
#### **M1.2.6. Regeneración de plantas a partir de los cotiledones transformados.**

Para inducir la formación de tallos, los fragmentos de cotiledón cultivados con *A. tumefaciens* se incubaron en placas Petri conteniendo medio SIM no selectivo (SIM-NS) (Tabla M4) durante 48 horas, a 24 °C/18 °C, día/noche, iluminación de 140  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y humedad relativa del 40-50 % y, posteriormente, en SIM selectivo (SIM-H) (Tabla M4, Figura M1d) en las mismas condiciones anteriores.



**Figura M1.** Transformación de cotiledones de tomate: a) plántulas de tomate obtenidas de semillas germinadas *in vitro* en medio GM; b) cultivo en PCM de segmentos de cotiledones aislados de plántulas cultivadas *in vitro*; c) cocultivo de segmentos de cotiledones y *Agrobacterium* en medio CCM; d) cultivo de los segmentos de cotiledones transformados en medio de organogénesis y selección de transformantes (SIM-H).

A partir de los cotiledones transformados, se observó la formación de callos verdes en la zona de corte del cotiledón después de aproximadamente 2 semanas de cultivo en medio de inducción de tallos (SIM-H) (Figura M2a). Estos callos verdes se subcultivaron en medio de inducción de tallos cada 3 semanas, detectándose la formación de tallos hasta tres meses después del inicio del cultivo en este medio (Figuras M2b, c y d). Se observó que por cada explanto se inducían de uno a tres tallos independientes (Figura M2d).



**Figura M2.** Regeneración de tallos a partir de cotiledones transformados: a) y b) cultivo en placas Petri con medio SIM-H; c) y d) cultivo en recipientes MAGENTA con medio SIM-H.



**Figura M3.** Inducción de raíces *in vitro* en medio RM-H

Transcurridas 8-9 semanas desde el inicio de la formación de los tallos (aproximadamente tres subcultivos en medio de inducción de tallos), éstos eran transferidos a medio de enraizamiento RM-H (Tabla M4), previa separación del callo a partir del cual se originaron. La formación de las raíces comenzaba tras aproximadamente 20 días de cultivo en este medio. Después de aproximadamente 4 semanas, las raíces presentaban un desarrollo adecuado para permitir el crecimiento *ex vitro* de la planta (Figura M3), momento en que las plántulas se transferían a macetas con la mezcla de turba y vermiculita (apartado M1.2.3) (Figura M4).



**Figura M4.** Cultivo en maceta en turba y vermiculita de una planta de tomate regenerada a partir de cotiledones transformados.

**Tabla M4.** Composición de los medios de cultivo usados en los experimentos de transformación de tomate. Las cantidades están referidas a un litro de medio.

	GM	PCM	CCM	WM	SIM-NS	SIM-H	RM-H
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	-
Higromicina (mg)	-	-	-	-	-	50	50
Cefotaxima (mg)	-	-	-	600	400	300	-
Acetosiringona ( $\mu$ M)	-	-	200	-	-	-	-
Agar (g)	8	8	8	-	8	8	8

MS: Murashige y Skoog (1962)

GM: medio de germinación

PCM: medio de precultivo

CCM: medio de co-cultivo

Vitaminas SH: Shahin EA (1985)

WM: medio de lavado

SIM: medio de inducción de tallos

NS, no selectivo; H, selectivo (higromicina 50  $\mu$ g/ml)

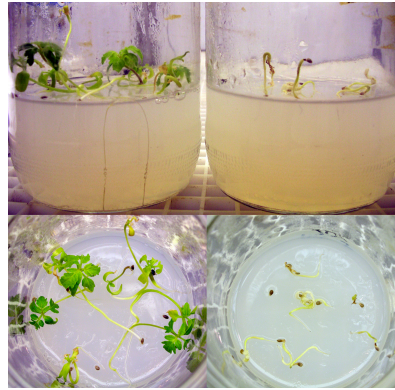
RM: medio de enraizamiento

**M1.2.7. Selección de transformantes y propagación de líneas transgénicas.**

Las líneas transgénicas se establecieron a partir de semillas de plantas transformadas, que se germinaron en medios conteniendo el antibiótico de selección, en nuestro caso higromicina. Para ello, se determinó previamente la concentración adecuada de higromicina mediante ensayos de germinación en presencia de 15, 30 y 50  $\mu$ g/ml de higromicina. Se comprobó que cuando se adicionaba al medio de germinación 15 y 30  $\mu$ g/ml de higromicina, las semillas de plantas no transformadas germinaban y daban lugar a plántulas que crecían *in vitro*. Sin embargo, cuando el



medio de germinación era suplementado con 50  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina si bien algunas semillas germinaban no se observaba la formación de hojas en ninguna de las plantas no transformadas (Figura M5). Por ello, la selección de las líneas transformantes de tomate se realizó por germinación de semillas en medio GM suplementado con 50  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina.



**Figura M5.** Germinación de semillas de tomate no transformadas. Las semillas germinaron en medio GM suplementado con 30  $\mu\text{g/ml}$  (izquierda) o 50  $\mu\text{g/ml}$  (derecha) de higromicina.

Cada una de las plantas regeneradas en presencia del antibiótico higromicina y transferidas a suelo se identificó como una línea transformante primaria independiente, originada a partir de un evento individual de transformación, y fueron consideradas como primera generación segregante o T1, identificándose con un único número (Ej: Línea 1, Línea 2, Línea 3). Estas plantas se transfirieron a semilleros conteniendo turba y vermiculita (apartado M.1.2.3) y posteriormente a macetas de 3 litros, manteniéndose en invernadero con solución de riego hasta que se produjo la floración y fructificación. Semillas procedentes de plantas T1 se germinaron *in vitro* en medio GM (apartado M1.2.2) suplementado con 50  $\mu\text{g/ml}$  higromicina, seleccionándose las plántulas que presentaban clara resistencia al antibiótico (cotiledones y hojas verdes, con raíces secundarias). Estas plantas se transfirieron a semilleros cuando alcanzaron el estado de 4 hojas y mas tarde al invernadero con solución de riego hasta que se produjo la floración y fructificación, y fueron consideradas como segunda generación segregante o plantas T2,

identificándose con dos números, el primero correspondiente a la línea T1 de la que proceden y el segundo a un identificador diferencial de cada planta (Ej: Línea 1-1, Línea 1-2,...). Finalmente, semillas procedentes de plantas T2 se germinaron *in vitro* en presencia de 50 µg/ml higromicina, seleccionándose las plántulas que presentaban clara resistencia al antibiótico. Estas plantas se transfirieron a semilleros y más tarde al invernadero hasta su fructificación, y fueron consideradas como tercera generación segregante o plantas T3 homocigotas, que se identificaron con tres números, el primero y el segundo correspondientes a las líneas T1 y T2 de las que procedían, y el tercero a un identificador diferencial de cada planta (Ej: Línea 1-1-1, Línea 1-1-2,...).

En todos los casos se evitó la fecundación cruzada separando unas macetas de otras aproximadamente medio metro y se favoreció la autofecundación depositando el polen de cada planta sobre estigmas de flores de la misma planta con un pincel.

Para la realización de los diferentes ensayos, las plantas empleadas resultaron ser mono-locus para el transgen y homocigotas, salvo en los casos en los que fue posible trabajar con plantas T3, donde se empleó plantas T2 para la realización de estos.

#### **M1.2.8. Recolección y conservación de semillas de plantas transformadas.**

Se recolectaron los frutos maduros (aproximadamente 3 meses desde la germinación de las semillas). Se separaron las semillas del resto de material, se lavaron en agua destilada y se secaron entre láminas de papel de filtro durante dos días en oscuridad. A continuación, las semillas se transfirieron a bolsas de plástico que fueron selladas y se almacenaron a 4 °C, en oscuridad y protegidas de la humedad hasta su uso.

**M1.2.9. Tratamientos salinos y de deficiencia en potasio.**

Se analizó el efecto del NaCl sobre el fenotipo de plantas de tomate transgénicas y no transformadas en diferentes estadios: plántulas jóvenes y plantas adultas.

Para los ensayos en plántulas, se germinaron semillas de tomate en placas Petri de 9 cm que contenían medio GM (apartado M1.2.2). Después de 2-4 días en oscuridad a 26 °C, las semillas germinadas que presentaban una radícula de 1,5 cm se transfirieron a placas cuadradas (10x10 cm) conteniendo medio GM suplementado con 0, 80, 120 y 150 mM NaCl. Se cubrieron parcialmente las placas con papel de aluminio en la zona de desarrollo de la raíz y se colocaron en posición semivertical en una cámara de cultivo a 24 °C/18 °C, día/noche, iluminación de 140  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una humedad relativa del 40-50%. Las plántulas se mantuvieron en estas condiciones durante 5 días, tomándose medidas de longitud de la raíz primaria a 0, 3 y 5 días y el peso fresco de las plántulas al final del ensayo. Asimismo, plántulas de 5 días cultivadas en medio GM con 0 y 120 mM NaCl fueron transferidas a sistemas de cultivo hidropónico suplementando la solución nutritiva con 0 y 120 mM NaCl hasta el final del tratamiento.

Para los ensayos de tolerancia salina en plantas adultas, plantas de 21 días fueron transferidas a sistema hidropónico en las condiciones descritas en el apartado M1.2.4 durante 4 días a fin de favorecer la adaptación al nuevo medio. Para los ensayos con NaCl, las plantas fueron seguidamente tratadas con presencia 0 y 120 mM NaCl durante 15 días adicionales y se realizaron muestreos a los 5 días del inicio del tratamiento y a tiempo final. El material recogido a los 5 días del inicio del tratamiento fue el empleado para el análisis de la expresión génica (apartado M2.1.9), para el análisis del contenido iónico (apartado M1.2.10) y para las medidas de actividad antiportadora (apartado M2.2.6).

Para los ensayos de deficiencia de  $K^+$ , las plantas cultivadas durante 25 días en sistema hidropónico en las condiciones descritas con anterioridad, fueron lavadas con 0,2 mM  $CaSO_4$  durante 30 minutos y, posteriormente, se transfirieron a solución de cultivo hidropónico desprovista de  $K^+$  (apartado M1.2.4) durante 35 días, realizándose muestreos a los 5 días y a tiempo final del tratamiento.

Para todos los ensayos y en cada uno de los muestreos (5 y 15 días para los ensayos con NaCl y 5 y 35 días para los ensayos de déficit de  $K^+$ ), se determinó el peso fresco total y los pesos de la raíz, del tallo y de las hojas de cada planta. En los muestreos de 5 días se congelaron en  $N_2$  líquido pequeñas cantidades del material fresco y se almacenaron a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , hasta su utilización. En el caso de las raíces, previamente se realizaron 4 lavados con agua desionizada, secándose posteriormente el tejido entre papeles de filtro. Para las determinaciones de peso seco y contenido iónico, los diferentes tejidos se secaron durante 2 días en estufa a  $80\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **M1.2.10. Evaluación del fenotipo.**

Se evaluaron diversos parámetros fisiológicos de las plantas transformadas en función de los tratamientos salinos y de deficiencia de  $K^+$ . A nivel de plántula se determinó el crecimiento longitudinal de la raíz en el tiempo en base a la ecuación:  $\text{Crecimiento} = (D_2 - D_1) / (t_2 - t_1)$ , donde  $D_1$  y  $D_2$  son la longitud de la raíz a tiempo 1 y 2, respectivamente, y donde  $t_1$  y  $t_2$  corresponden al tiempo en el que se tomó el primer y último muestreo respectivamente.

A nivel de planta adulta se determinó la producción total de flores y frutos a lo largo de las distintas generaciones (T1, T2 y T3). Así mismo, se determinó la velocidad relativa de crecimiento (RGR –*relative growth rate*–) según la ecuación:  $\text{RGR} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$ , donde  $W_1$  y  $W_2$  son el peso seco total de la planta completa a tiempo 1 y 2, respectivamente, y  $t_1$  y  $t_2$  corresponden al tiempo en el que se tomó el primer y último muestreo, respectivamente (Guerrier, 1996).

La savia xilemática se recolectó 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). Se desechó la savia xilemática exudada durante los 10 minutos que siguen a la decapitación, para prevenir su contaminación con el contenido de células dañadas o con savia floemática y se recolectó el volumen de savia xilemática exudada en los 15 minutos siguientes.

Para la cuantificación de los contenidos iónicos, el material seco previamente molido se digirió en una solución concentrada HNO<sub>3</sub>: HClO<sub>4</sub> (2:1, v/v). Los contenidos de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> se determinaron en el material digerido y en la savia xilemática por ICP-MS (Iris Intrepid II; Thermo Electron Corporation, Franklin, MA, USA) en el Servicio de Ionómica del CEBAS, CSIC, Murcia.

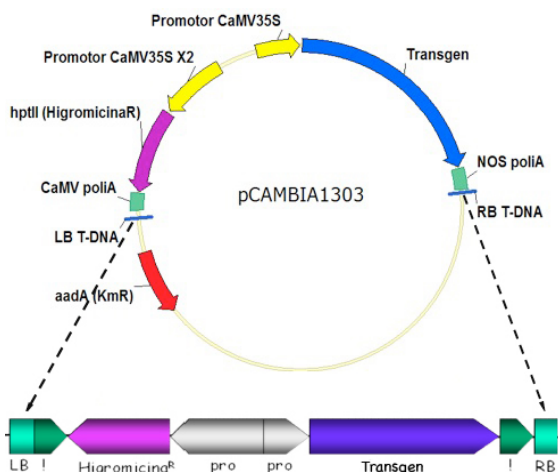
## M2. Métodos.

### M2.1. Métodos generales de manipulación de ácidos nucleicos.

En la tabla M5 se muestran las construcciones génicas utilizadas en este trabajo.

**Tabla M5.** Construcciones génicas utilizadas para la transformación de tomate.

Plásmido	Características	Referencia
pCAMBIA1303	Vector de expresión, promotor 35S, Higromicina <sup>R</sup>	Roberts et al. (1997)
pCAMBIA1303-LeNHX2	LeHNX2, clonado en pCAMBIA1303 entre los sitios <i>Nco I</i> y <i>BstEI</i>	Rodríguez-Rosales et al. (2008)
pCAMBIA1303-SISOS2	SISOS2, clonado en pCAMBIA1303 entre los sitios <i>Bgl II</i> y <i>Pml (BbrPI)</i>	Olías et al. (2008)
pCAMBIA1303-SISOS3	SISOS3, clonado en pCAMBIA1303 entre los sitios <i>NcoI</i> y <i>Pml (BbrPI)</i>	Olías et al. (2008)
pCAMBIA1303-SINhaD	SINhaD, clonado en pCAMBIA1303 entre los sitios <i>Bgl II</i> y <i>BstEII</i>	Li J, Olías R y Berver A, (Resultados no publicados)



**Figura M6.** Representación esquemática del vector pCambia1303. La fusión de *gusA*-mGFP5-Histidinas que presentaba el vector original fue sustituida por cada uno de los transgenes. RB (borde derecho) y LB (borde izquierdo) delimitan el fragmento de DNA que se integrara en el genoma de la planta receptora.

**M2.1.1. Amplificación por PCR.**

Los reactivos utilizados para PCR (reacción en cadena de la polimerasa), las concentraciones de cada uno de ellos y la duración de las distintas etapas de la reacción dependen del objetivo de la amplificación, la naturaleza de los cebadores utilizados o la enzima DNA polimerasa usada, entre otros factores. De forma general, el protocolo seguido en este trabajo se resume en la Tabla M6.

**Tabla M6.** Protocolo general de PCR.

Mezcla PCR	Programa PCR
dNTPs (0,2 mM)	- Inicialización (94 °C, 3 minutos)
cebador directo (0,3 μM)	- 25 a 30 ciclos
cebador reverso (0,3 μM)	-Desnaturalización (94 °C, 30 segundos)
MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)	- <i>Annealing</i> (50-60 °C dependiendo de los cebadores, 45 segundos)
disolución tampón (1x)	-Extensión (72 °C, 1,5 minutos)
DNA polimerasa (0,02 U/μl)	- Extensión final (72 °C, 7 minutos)
DNA molde (20 ng - 200 ng)	- Conservación (4 °C, tiempo indefinido)

Para amplificaciones por PCR de rutina se emplearon los cebadores: Hyg1F (5'- GATGTTGGCGACCTCGTATT -3') y Hyg1R (5'- GTGCTTGACATTGGGGAGTT -3'), que amplifican un fragmento de 468 pb de la zona intermedia del gen de resistencia a Higromicina, y enzimas DNA polimerasas termoestables procedentes de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Taq) de diferentes casas comerciales (Sigma-Aldrich Química, España; MBL, Dominion; Eppendorff). El termociclador utilizado fue un *Mastercycler personal* (Eppendorf).

#### **M2.1.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.**

Se ha realizado según se describe en Sambrook et al., (1989). Los fragmentos de DNA, procedentes de digestiones con enzimas de restricción o de reacciones de PCR, a partir de DNA genómico o plasmídico, así como el RNA total aislado, se separaron en geles horizontales de agarosa del 0,8 al 2 % (p/v), dependiendo del tamaño del DNA. Los geles contenían bromuro de etidio (0,4 µg/ml) para visualizar las bandas a la luz ultravioleta, y se prepararon en TBE 1x (45 mM Tris, 1,25 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 45 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8,2) (ApplyChem, Alemania).

Las muestras de DNA o RNA se prepararon en tampón de carga (sacarosa 8,33 % (p/v), Azul de Bromofenol 0,04 %, EDTA 0,017 M). La separación electroforética se realizó en el mismo tampón utilizado para la preparación del gel, a 100 V. En el caso de los ensayos de *Southern blot* (apartado M2.1.8), la separación electroforética de cantidades equivalentes de DNA genómico sin digerir y después de ser digerido con diferentes enzimas de restricción (apartado M2.1.7) se realizó en gel de agarosa al 0,8 % (p/v) en TBE 1x, a 15V durante 12 horas.

El tamaño de los fragmentos de interés se estimó por comparación con un marcador comercial (*1Kb DNA ladder Molecular Weight Marker*, Genecraft). La visualización del DNA en los geles de agarosa se realizó con ayuda del analizador de imagen Gel Doc 2000 (Bio-Rad Molecular Imagen System).

### **M2.1.3. Cuantificación de DNA y RNA.**

La concentración de DNA o RNA se estimó espectrofotométricamente utilizando un *NanoDrop*<sup>®</sup> *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies). Las relaciones  $DO_{260}/DO_{280}$  y  $DO_{260}/DO_{230}$  se usaron para estimar la contaminación de la preparación por proteínas y polisacáridos, respectivamente. Alternativamente, la cuantificación de los fragmentos de DNA en gel se realizó por comparación visual al ultravioleta en Analizador de imagen (BioRad) con una cantidad conocida del DNA de fago  $\lambda$  digerido con *EcoRI-HindIII* (*Molecular Weight Marker III*, Roche Diagnostic).

### **M2.1.4. Aislamiento de DNA plasmídico.**

Se partió de colonias individuales de *A. tumefaciens* crecidas en 10 ml de medio TYNG (Tabla M2) suplementado con los antibióticos adecuados, en agitación orbital a 225-250 rpm y 28 °C durante dos días. El cultivo se sometió a fuerte agitación para romper los grumos formados por agregación de células. Se tomó una alícuota de 1 ml y se centrifugó, obteniéndose un sedimento celular que se resuspendió en 200  $\mu$ l de tampón STET (10 % Sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1% Tritón X-100). Tras agitación de al menos 10 minutos, se añadió 5  $\mu$ l de una solución de lisozima al 5 % y se incubó la mezcla 2 minutos a 96 °C. Seguidamente, se enfrió en hielo durante 2 minutos y se centrifugó en microcentrífuga a máxima velocidad durante 10 minutos, desechándose el sedimento mucoso. Se adicionó al sobrenadante 2  $\mu$ l RNAsa 1%, y se incubó 10 minutos a 68 °C para eliminar contaminaciones de RNA. Para precipitar el DNA plasmídico se añadió 10  $\mu$ l de tampón CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 5% y NaCl 0,5 M), se agitó y se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 300  $\mu$ l de NaCl 1,25 M y se precipitó nuevamente el DNA, adicionando 750  $\mu$ l de etanol al 96 %. Tras centrifugar a 14000



rpm durante 15 minutos, se lavó el precipitado con 700  $\mu$ l de etanol al 70 % y se secó a 37 °C durante 10 minutos. El DNA se resuspendió en 20  $\mu$ l de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) o en H<sub>2</sub>O destilada.

#### **M2.1.5. Aislamiento de DNA genómico de tomate.**

La extracción se llevó a cabo por el procedimiento descrito por Edwards et al., (1991). Aproximadamente, 0,5 g de hojas se homogenizaron con mortero y pistilo en N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. El homogenado se transfirió a un tubo eppendorf, y se adicionaron 0,5 ml de un tampón de extracción compuesto por 0,8 % CTAB (p/v), 140 mM sorbitol, 220 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,8 M NaCl, 22 mM EDTA y 1% N-laurilsarcosina (p/v), precalentado a 65 °C y 0,5 ml de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v). El conjunto se mezcló por enérgica agitación en vortex y se centrifugó 5 minutos a 16000 g, transfiriéndose el sobrenadante a un nuevo eppendorf. Seguidamente se añadió 1 volumen de isopropanol frío suplementado con 50  $\mu$ l de acetato sódico 3M y se agitó por inversión, incubándose a -20 °C durante 1 hora. La suspensión se centrifugó 10 minutos a 16000 g, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0,5 ml de etanol frío al 70 % (v/v). Tras centrifugar 5 minutos a 16000 g, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó en campana extractora durante 15 minutos. El sedimento conteniendo el DNA genómico de hoja de tomate, se resuspendió en agua milliQ suplementada con RNAsa (0,1 mg/ml), conservándose a -80 °C.

#### **M2.1.6. Aislamiento de RNA de tomate.**

Todo el material utilizado para la extracción de RNA fue tratado para la eliminación de posibles contaminaciones por RNAsa (Sambrook et al 1989). El material de vidrio y de porcelana se trató en horno de esterilización durante 4 horas a 170 °C, y el material de plástico, se autoclavó antes de ser utilizado. El agua y

soluciones utilizadas se trataron con 0,1 % (v/v) DEPC (dietil pirocarbonato) durante al menos 12 horas en agitación, tras lo cual se autoclavaron para inactivar el DEPC, manteniéndose posteriormente en agitación durante otras 12 horas adicionales, para eliminar los productos de desecho del DEPC.

El RNA se extrajo de raíces previamente almacenadas a -80 °C (apartado M1.2.10.) utilizando el reactivo *Tri-Reagent*<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich Química, España). Las raíces se trituraron en mortero con N<sub>2</sub> líquido, hasta obtener un polvo muy fino. Se añadió 1 ml de *Tri Reagent* por cada 100 mg de tejido de partida, y se agitó vigorosamente utilizando un vortex. Tras centrifugar 10 minutos a 12000 g y 4 °C, se añadió al sobrenadante 0,2 ml de cloroformo, agitándose primero y, posteriormente, manteniéndose 10 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar 15 minutos a 12000 g y 4 °C, la fase acuosa se transfirió a un tubo estéril de 1,5 ml. El RNA total se precipitó añadiendo 0,5 ml de isopropanol, mediante incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente y posterior centrifugación a 16000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el precipitado de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v) en agua-DEPC, secándose durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Cada muestra de RNA total se resuspendió en 40 µl de *RNAsecure*<sup>TM</sup> *Resuspension solution* (Ambion Europa, Ltd) y se incubó durante 10 minutos a 60 °C, para minimizar la degradación del RNA, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Posteriormente se trató el RNA con DNAsa (RNase-Free DNase Set, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar el DNA presente en las muestras. Finalmente, el RNA 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 RNA y la ausencia de degradación o contaminación con DNA genómico se comprobó mediante la visualización al UV en

analizador de imagen de las bandas de RNA ribosómico en geles de TBE con bromuro de etidio (apartado M2.1.2).

#### **M2.1.7. Digestión de DNA con enzimas de restricción.**

La digestión con enzimas de restricción del DNA genómico se ha llevado a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche Diagnostics) respecto al tipo de tampón y temperatura de reacción. Una reacción típica de digestión incluía 100-500 ng del DNA, 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 DNA en 1 hora en las condiciones óptimas de reacción) en un volumen total de 10-20 µl, incubándose la reacción durante 1-2 horas a las condiciones óptimas de temperatura para cada enzima, generalmente 37 °C.

En el caso de los ensayos de tipo *Southern blot* y, debido a la cantidad de DNA genómico empleado, la digestión del DNA se llevó a cabo en dos fases. Se utilizaron 15 µg de DNA y se digirieron 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 de la misma enzima, manteniéndose el conjunto en incubación durante 12-16 horas a la misma temperatura para forzar al máximo la digestión.

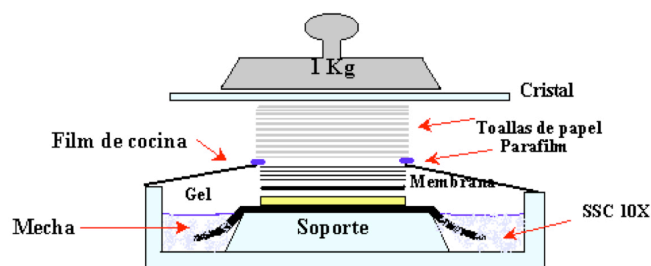
#### **M2.1.8. Análisis *Southern* del DNA genómico de tomate.**

##### M2.1.8.1. Transferencia a membranas de nylon.

Prévio a la transferencia a membranas de nylon, se efectuó una depuración ácida del DNA separado por electroforesis (apartado M2.1.2). Para ello, se sumergió el gel en 0,25 N HCl durante aproximadamente 10 minutos, 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 DNA, sumergiendo el gel durante 15 minutos 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 minutos 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 M7. Se preparó una membrana de nylon (*Hybond<sup>TM</sup> N<sup>+</sup>*, 0,2  $\mu\text{m}$  de poro, Amersham, Pharmacia Biotech) del mismo tamaño que el gel, sumergiéndose en agua destilada y después durante 5 minutos en tampón SSC 20 x (3 M NaCl y 0,3 M citrato sódico, pH 7,0). 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 10 x. 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 10 x; 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 2 x SSC durante 5 minutos y se fijó el DNA mediante calentamiento a 120 °C en condiciones de vacío, durante 30 minutos. Las membranas se guardaron al vacío a 4 °C hasta su uso.



**Figura M7.** Esquema de la unidad de transferencia empleada en los experimentos de Southern blot.

#### M2.1.8.2. Hibridación del DNA con sondas radiactivas.

Como sonda se utilizó el fragmento de 468 pb de la zona intermedia del gen de resistencia a Higromicina, obtenido por PCR (apartado M2.1.1), una vez comprobado mediante PCR que dicho fragmento no amplificaba ninguna secuencia genómica en las plantas sin transformar y que no era digerido por ninguna de las enzimas de restricción utilizadas con el DNA genómico (apartado M2.1.7). Este fragmento se diluyó en TE a una concentración de 40 ng en un volumen de 45  $\mu$ l. Posteriormente, se desnaturalizó por calor (95-100 °C) durante 5 minutos y se conservó en hielo para evitar su renaturalización.

El producto de PCR se marcó con 5  $\mu$ l de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (3000 Ci mmol<sup>-1</sup>) por el método del cebamiento al azar (*random priming*) (Sambrook et al. 1989), utilizando el kit comercial *Rediprime<sup>TM</sup>II* (Amersham Pharmacia Biotech), que contenía dATP, dGTP, dTTP y el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I de *E. coli*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla se incubó 45 minutos a 37 °C y transcurrido este tiempo se adicionó 5  $\mu$ l de 0,2 M EDTA para detener la reacción. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, los fragmentos marcados con <sup>32</sup>P se purificaron por centrifugación en *Mini Quick Spin<sup>TM</sup> columns* (Roche Diagnostics) que contenía Sephadex G-50, en tampón STE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 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 minutos, conservándose la sonda en hielo para evitar su renaturalización.

La hibridación se llevó a cabo de acuerdo con Church y Gilbert (1984). Brevemente, se realizó una prehibridación a 55 °C con 0,3 ml de medio PSE/cm<sup>2</sup> de membrana. El medio PSE contenía 7 % (p/v) SDS, 0,3 M fosfato sódico, pH 7,2 y 1 mM EDTA, y la prehibridación llevada a cabo con él se efectuó durante al menos 1 hora. Tras eliminar la solución de prehibridación, la hibridación se llevó a cabo incubando la membrana de nylon con 30  $\mu$ l de medio PSE/cm<sup>2</sup> de membrana. En este

caso el medio PSE contenía la sonda previamente marcada y desnaturalizada, realizándose la hibridación durante 16-24 horas a 55 °C. Finalmente, se realizaron 4 lavados (50 ml/filtro) de 15 minutos en las siguientes condiciones: un primer 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 cassette 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).

### **M2.1.9. PCR a tiempo real.**

Para la síntesis de la primera hebra de cDNA se ha utilizado el *Enhanced Avian HS Reverse Transcription kit* (Sigma-Aldrich Química, España). Para ello se utilizaron 4 µg de RNA total tratado con DNAsa (apartado M2.1.6), 500 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 3,5 µM Oligo(dT)<sub>23</sub> anclado en un volumen de 10 µl. Tras incubar la mezcla a 70 °C durante 10 minutos y un rápido enfriado en hielo, con objeto de desnaturalizar el RNA, se añadió 1 U de inhibidor de RNAsa, 1 U de enzima transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de ave (AMV-RT) y 1x del tampón de la reacción AMV-RT (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 40 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (Ditiotreitol), en un volumen total de 20 µl, incubándose a 48 °C durante 50 minutos. El cDNA se utilizó inmediatamente o se guardó a -20 °C hasta su posterior uso.

Para la reacción de PCR a tiempo real se ha utilizando un termociclador iCycler (Biorad). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 23 µl conteniendo 12,5 µl de la mezcla de *Quantimix Easy Syg Kit* (Biotools) o iQ SyBr Green Supermix (BioRad), 0,375 µM de cada cebador (Tabla M7), 1 µl de cDNA y 8,5 µl de agua Milli-Q. El protocolo de amplificación usado fue: Ciclo 1 (1X), 95 °C, 114

3 minutos; ciclo 2 (35X), desnaturalización a 95 °C, 30 segundos, *annealing* a 55 °C, 45 segundos, extensión a 72 °C, 1 minuto; ciclo 3 (1X), 95 °C, 1 minuto; ciclo 4 (1X), 70 °C, 1 minuto; ciclo 5 (60X), 70 °C, 10 segundos. Una vez concluido el ciclo 2, se obtuvieron los datos necesarios para llevar a cabo la cuantificación a tiempo real. La expresión relativa del gen se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula:  $2^{[\Delta C_t(\text{Referencia}) - \Delta C_t(\text{Problema})]}$ , donde  $\Delta C_t = C_{t \text{ factor elongación}} - C_{t \text{ gen problema}}$  y  $C_t$  (Ciclo umbral) es el ciclo en el que la fluorescencia de la muestra excede el valor elegido sobre un umbral, es decir, el ciclo en el cual el sistema comienza a detectar el incremento de la señal asociada con un aumento exponencial del producto de PCR durante la fase lineal logarítmica.

Todas las reacciones se realizaron por triplicado y para cada ensayo de PCR se obtuvieron las curvas de *Melting* de los productos de amplificación con el fin de identificar las posibles amplificaciones inespecíficas.

Todos los cebadores utilizados fueron sintetizados y purificados por filtración en gel por la compañía TIB-MOL.BIOL, Berlín, subsidiaria de Roche Diagnostics S.L. Applied Science) (Tabla M7).

**Tabla M7.** Cebadores utilizados en los ensayos de PCR a tiempo real para cuantificar los niveles de expresión y tamaño del fragmento amplificado.

Cebadores	Secuencia	Amplicón
LeNHX2 directo	5'-CCTTTGAGGGGAACAATGG-3'	173 pb
LeNHX2 reverso	5'-CATCTTCATCTTCGTCTCC-3'	
SISOS2 directo	5'- CTGCTTAGGACAAGGACTCG -3'	112 pb
SISOS2 reverso	5'- GGTATAGTGTGTGTAAGTGC -3'	
SISOS1 directo	5'- TCGAGTGATGATTCTGGTGG -3'	129 pb
SISOS1 reverso	5'- GAGCCTTCCACACTGTGAT -3'	
SISOS3 directo	5'- GCTTTGTGATGAACTCTGAGG -3'	187 pb
SISOS3 reverso	5'- GAAGTTGGCTACCCAGATT -3'	
SINhaD directo	5'- ACAGCTCTGGCTCAAATTCC -3'	153 pb
SINhaD reverso	5'- GGTGGAGATGAAAATGCCAT -3'	
LeHAK5 directo	5'- GTATGATGTGACCGTGTACG -3'	120 pb
LeHAK5 reverso	5'- TCAGATCCTGTGATGCAAAGG -3'	
LeEF1a directo	5'- GACAGGCGTTCAGGTAAGGA -3'	119 pb
LeEF1a reverso	5'- GGGTATTCAGCAAAGGTCTC -3'	

## M2.2. Aislamiento de membranas celulares.

### M2.2.1. Obtención de microsomas.

Para el aislamiento de microsomas de raíz, plantas no transformadas y transgénicas fueron cultivadas en sistema hidropónico en las condiciones descritas en el apartado M1.2.4, en presencia y ausencia de 120 mM NaCl durante los últimos 3 días. Una vez separadas del resto de la planta, las raíces se lavaron con agua desionizada, secándose por centrifugación manual entre papeles de filtro con secadora de verduras. Posteriormente, las raíces se trocearon y se homogeneizaron en Sorvall Omnimixer con un tampón (1:2, peso fresco/volumen) compuesto por 25 mM BTP, 0.2 % (p/v) BSA, 250 mM manitol, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de EGTA-BTP, pH 7.5, 10 % (v/v) glicerol, 2.5 % (p/v) PVP-40, 2 mM DTT, 1 mM PMSF



(fenilmetilsulfonilfluoruro), y 5 mM metabisulfito sódico, pH 8,0 con ácido sulfúrico. El homogenado se filtró a través de 6 capas de gasa, y el extracto obtenido se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se centrifugó durante 35 minutos a 100000 g, obteniéndose un sedimento correspondiente a la fracción microsomal, que se resuspendió en tampón de conservación (250 mM Manitol, 2 mM BTP-MES, pH 7,5, 1 mM EGTA-BTP pH 7,5, 10 % (p/v) glicerol, 2 mM DTT, 0,1 mM PMSF y 0,2 % (p/v) BSA), se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. En los casos en que los microsomas se utilizaron para purificar algún tipo de membranas celulares (Figura M8), el sedimento obtenido por centrifugación a 100000 g se resuspendió en los tampones adecuados para tal fin. Todo el proceso de aislamiento de membranas se llevó a cabo a 4 °C.

#### **M2.2.2. Aislamiento de endomembranas.**

Se ha seguido esencialmente el procedimiento descrito por Rodríguez-Rosales et al., (2008). Los microsomas aislados (apartado M2.2.1.) a partir de raíces de plantas de tomate que sobreexpresan LeNHX2, se resuspendieron en 2 ml de tampón de aislamiento de endomembranas compuesto por 10 mM Tris-Mes pH 7,6, 1 mM EGTA, 25 mM KCl, 1,1 M glicerol, 0,2 % (p/v) BSA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF y 1 mg/l leupeptina, en sacarosa al 15 % (p/p). Las membranas resuspendidas se cargaron sobre un colchón de sacarosa constituido por 15 ml de sacarosa al 35 % (p/p) en tampón de aislamiento de endomembranas, y se centrifugó el conjunto a 83000 g durante 1,5 h. Las vesículas enriquecidas en endomembranas se recogieron en la interfase 15 %-35 %, se diluyeron en 25 ml de 5 mM Tris-Mes pH 7,6, 0,3 M Sorbitol, 1 mM EGTA, 0,1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 1 mg/l leupeptina y se centrifugaron nuevamente a 100000 g durante 35 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 0,5 ml de 0,3 M sorbitol, 5 mM Tris-Mes pH 7,6, 1 mM PMSF y 1 mM DTT, congelándose en nitrógeno líquido y almacenándose a -80 °C hasta su uso.

**M2.2.3. Purificación de vesículas de plasmalema.**

Los microsomas (apartado M2.2.1) obtenidos a partir de raíces de plantas de tomate que sobreexpresan SISOS2, se resuspendieron en 2 ml de tampón de partición (330 mM sacarosa, 5 mM fosfato potásico, pH 7,8, y 0,1 mM PMSF).

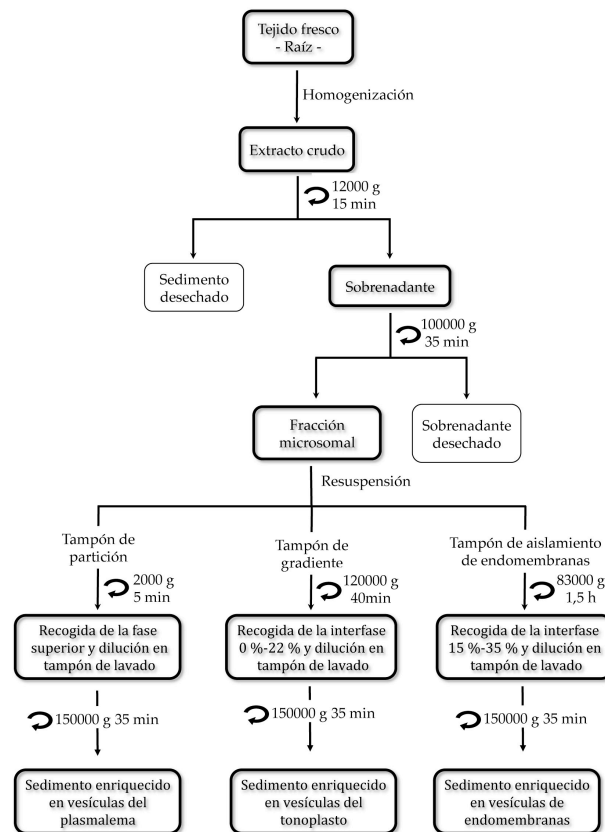
La purificación de plasmalema se llevó a cabo por el método de partición de fases en sistemas de dos polímeros acuosos, polietilenglicol (PEG) y dextrano, siguiendo los protocolos descritos por Kerkeb et al., (2001) y Olías et al., (2009a). Se prepararon tubos de vidrio *Corex* conteniendo 20 g de fases compuestas por 6,4 % (p/p) Dextrano T500, 6,4 % (p/p) PEG 3350, 2 mM KCl, 330 mM sacarosa, 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. La fase superior, 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 35 minutos. El sedimento enriquecido en plasmalema se resuspendió en tampón de conservación 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, al que se le añadió 0,2 % (p/v) de BSA, una vez tomadas las alícuotas para la determinación de su contenido protéico. Las membranas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron en alícuotas de 20 µl a -80 °C para su posterior uso.

**M.2.2.4. Purificación de vesículas de tonoplasto.**

Los microsomas (apartado M2.2.1) purificados a partir de raíces de plantas de tomate que sobreexpresan SISOS2, se resuspendieron en 2 ml de tampón de gradiente (250 mM manitol, 2 mM BTP-MES, pH 8, 1 mM EGTA-BTP, pH 8, 0.1

mM PMSF y 2 mM DTT). La suspensión microsomal se añadió sobre un colchón de sacarosa de 15 ml de 22 % (p/p) de sacarosa preparado en tampón de gradiente, depositando dicho colchón, con la ayuda de una jeringa con un capilar largo, por debajo de la muestra previamente añadida en el tubo de centrifugación, para prevenir la perturbación de la interfase (Ballesteros et al., 1997). El conjunto se centrifugó a 100000 g durante 40 minutos en rotor basculante SW28 (Beckman).

La fracción de membrana de la interfase 0/22 se recogió directamente del tubo con una jeringa, y se diluyó en tampón de lavado, sedimentándose por centrifugación a 150000 g durante 35 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en tampón de conservación, almacenándose en alícuotas a -80 °C, tras congelarlas en N<sub>2</sub> líquido.



**Figura M8.** Esquema de la metodología seguida para la obtención de las distintas fracciones de membrana de raíz de tomate.

**M2.2.5. Cuantificación de proteínas.**

Las proteínas de membranas se cuantificaron por el método de Bradford (1976), modificado por Gogstad y Krutnes (1982), consistente en la adición de 0,1 % (v/v) Triton X-100, para solubilizar las proteínas, empleándose el reactivo de color concentrado de Bio-Rad, diluido 4 veces, y BSA como patrón.

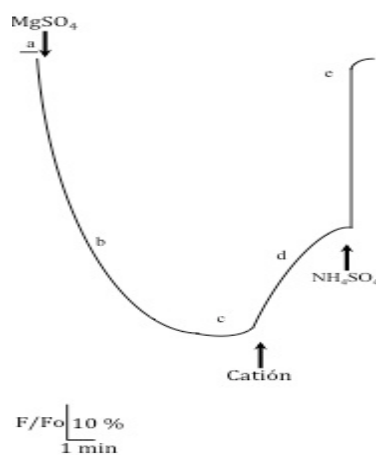
**M2.2.6. Determinación de la actividad de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de membrana.**

Se han seguido los procedimientos previamente descritos para la detección del intercambio  $\text{cation}/\text{H}^+$  en las vesículas aisladas de tonoplasto (Ballesteros et al., 1997), endomembranas (Rodríguez-Rosales et al., 2008) y plasmalema (Rodríguez-Rosales et al 1999; Olías et al., 2009a), mediante la disipación por el catión del gradiente de  $\text{H}^+$  previamente creado por las respectivas actividades  $\text{H}^+$ -ATPasas específicas de las membranas purificadas, utilizando ACMA como sonda fluorescente. La emisión de 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 y 485nm, respectivamente. La fluorescencia fue monitorizada en una célula termoestable a 26 °C en 1 ml de medio de reacción que contenía 50 µg de proteínas de membranas, 250 mM Manitol o Sorbitol, 10 mM BTP-MES, pH 6,5 (plasmalema) o 7,5 (tonoplasto y endomembrana), 1,5 mM ATP-BTP, pH 7,0, 100 mM TMA-Cl (Cloruro de tetrametilamonio), 1 µM ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina), 25 mM  $\text{KNO}_3$  (plasmalema) o KCl (tonoplasto y endomembrana) y 0,2 mg/ml Brij 58 (plasmalema), iniciándose la reacción por adición de 1,5 mM  $\text{MgSO}_4$ .

En estas condiciones, la enzima  $\text{H}^+$ -ATPasa, en presencia de Mg-ATP (Figura M9, trazo a), genera un gradiente de pH (interior ácido) que provoca la extinción

gradual de la fluorescencia de la sonda ACMA encapsulada en el interior de las vesículas (Figura M9, trazo b). Cuando el nivel de fluorescencia se estabiliza (Figura M9, trazo c), se inicia la reacción de antiporte mediante la adición de  $\text{Na}^+$ , en forma de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , o  $\text{K}^+$ , en forma de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , al medio de reacción, dando lugar a la recuperación de la fluorescencia debido a la relajación del gradiente de pH como resultado del intercambio catión/protón (Figura M9, trazo d). Al final del ensayo, se disipa el gradiente de pH por la adición de 12,5 mM  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (Figura M9, trazo e). El total de fluorescencia recuperada, medida como la diferencia entre la fluorescencia mínima y el nivel final de fluorescencia obtenido tras la adición de ionóforos, se estableció como 100% de fluorescencia y equivale al valor de extinción máxima de la sonda.

Para la cuantificación de la actividad antiportadora  $\text{Cation}/\text{H}^+$  se trazó la tangente a la curva en los primeros segundos tras la adición de la sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), para obtener la velocidad inicial de recuperación de la emisión de fluorescencia. La actividad se estimó en base al cociente entre la fluorescencia recuperada por unidad de tiempo y la cantidad de proteínas de la muestra en la cubeta de medida, así como en base a la extinción máxima de la fluorescencia (expresada como % Q).



**Figura M9.** Registro espectrofluorimétrico de la actividad antiportadora  $\text{Cation}/\text{H}^+$ . Las letras indican los diferentes componentes y están detalladas en el texto.

Como medida de pureza, las preparaciones de membrana obtenidas a partir de microsomas de raíz se caracterizaron utilizando inhibidores específicos para las actividades de transporte de  $H^+$  dependientes de ATP de los diferentes orígenes subcelulares. 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, azida ( $N_3^-$ ), inhibidor de las F- $H^+$ -ATPasas mitocondriales (Ballesteros et al., 1996 y 1997, Rodríguez-Rosales et al., 1999; Kerkeb, 2000; Kerkeb et al., 2001, Olías et al., 2009a).

#### **M2.2.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).**

Se partió de microsomas de plantas de tomate que sobreexpresan la proteína LeNHX2 etiquetada con una cola de 10 histidinas (RGSH<sub>10</sub>). Se resuspendieron 25  $\mu$ g de proteínas microsomales en 100 mM Tris-HCl pH 8,0 conteniendo 1 % SDS (dodecilsulfato sódico), 2 % glicerol, 10 mM DTT, 0,00125 % azul de bromofenol y 4 mM PMSF, incubándose la mezcla durante 30 minutos, a 30 °C. La separación de las proteínas solubilizadas se llevó a cabo en geles al 10 % de poliacrilamida utilizando un equipo Mini-Protean-3<sup>TM</sup> de Bio-Rad para geles de 8 x 7 cm y 1 mm de espesor (Laemmli 1970). La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente y a voltaje constante (100 V). Para el análisis del perfil proteico, los geles se tiñeron con Azul Coomassie y para los estudios de inmunodetección, las proteínas se electrotransfirieron desde los geles de poliacrilamida a membranas PVDF (fluoruro de polivinilideno).

#### **M2.2.8. Tinción de proteínas separadas por electroforesis.**

La visualización de las proteínas separadas por SDS-PAGE se llevó a cabo mediante tinción con Azul Coomassie. Los geles se fijaron y tiñeron directamente con Coomassie Brilliant Blue R al 0,25 % (p/v) en metanol:ácido acético:agua

(40:10:50, v/v/v), durante 1-2 horas en agitación, y se destiñeron durante 3-5 horas con metanol:ácido acético:agua (40:10:50, v/v/v).

#### **M2.2.9. Electrotransferencia e inmunodetección.**

Se realizó para la detección del antiportador LeNHX2 en membranas aisladas de plantas MicroTom silvestres y sobreexpresoras de LeNHX2 (Rodríguez-Rosales et al., 2008). Para ello, las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas PVDF en un equipo Mini trans-blot de BioRad, a voltaje constante (100 V) durante 90 minutos, a 4 °C y utilizando como tampón de transferencia 10 mM CAPS (Acido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico) pH 11, suplementado con metanol hasta una concentración final del 10 % (Towbin et al., 1979). A fin de visualizar el grado de transferencia, las membranas PVDF se tiñeron con rojo Ponceau (0,1 %), previamente a la incubación con los anticuerpos.

Tras la electrotransferencia, las membranas PVDF fueron incubadas durante 1,5 horas en 10 ml de tampón de bloqueo (150 mM NaCl, leche en polvo desnatada al 2,5 %, 20 mM Tris-HCl pH 8 y 0,05 % Tween 20). A continuación, la membrana fue incubada en 5 ml de tampón de bloqueo al que se añadió 1 µl del anticuerpo primario, incubándola toda la noche a 4 °C y en agitación suave. Se utilizó un anticuerpo monoclonal producido en ratón frente al epítipo RGSH<sub>4</sub> presente en la cola de histidinas de la proteína LeNHX2. Tras la incubación con el anticuerpo primario, los filtros PVDF fueron sometidos a 3 lavados sucesivos de 5 minutos con el tampón de bloqueo e incubados durante una hora y media con 10 ml del mismo tampón al que se había añadido 5 µl de anticuerpo secundario (anti IgG de ratón) ligado a la enzima fosfatasa alcalina. Tras 5 lavados de 5 minutos con el tampón de bloqueo, para eliminar los restos de anticuerpo secundario, y dos lavados en el tampón de revelado de la reacción de la fosfatasa alcalina (0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), se procedió al revelado de la reacción enzimática utilizando como

sustratos cromogénicos NBT (*nitro blue tetrazolium*) y BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato).



## **IV. RESULTADOS**



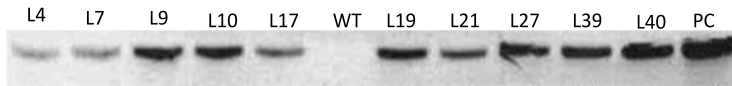
Se han obtenido plantas transgénicas de tomate mediante la transformación de cotiledones y posterior regeneración de plantas siguiendo básicamente el método descrito por Ellul et al., (2003) (apartados M1.2.5 y M1.2.6). Para ello se empleó *Agrobacterium tumefaciens*, transformado con las diferentes construcciones génicas para la sobreexpresión de LeNHX2, SISOS2, SISOS3 y SINhaD bajo el control del promotor constitutivo 35S y con el gen de resistencia a higromicina como marcador de selección (Roberts et al. 1997) (apartado M2.1, tabla M5).

En todos los ensayos realizados en este trabajo se han empleado plantas transgénicas con una única copia del transgen, seleccionadas mediante ensayos tipo *Southern blot*. Para los ensayos con LeNHX2, SISOS3 y SINhaD se emplearon plantas T3 homocigotas para el transgen según se dedujo del análisis de segregación mendeliana del carácter resistencia a higromicina. Para los ensayos con SISOS2, donde no se pudo usar plantas T3, se escogieron líneas T2 con alto porcentaje de homocigosis.

## **R1. Sobreexpresión de LeNHX2 en tomate.**

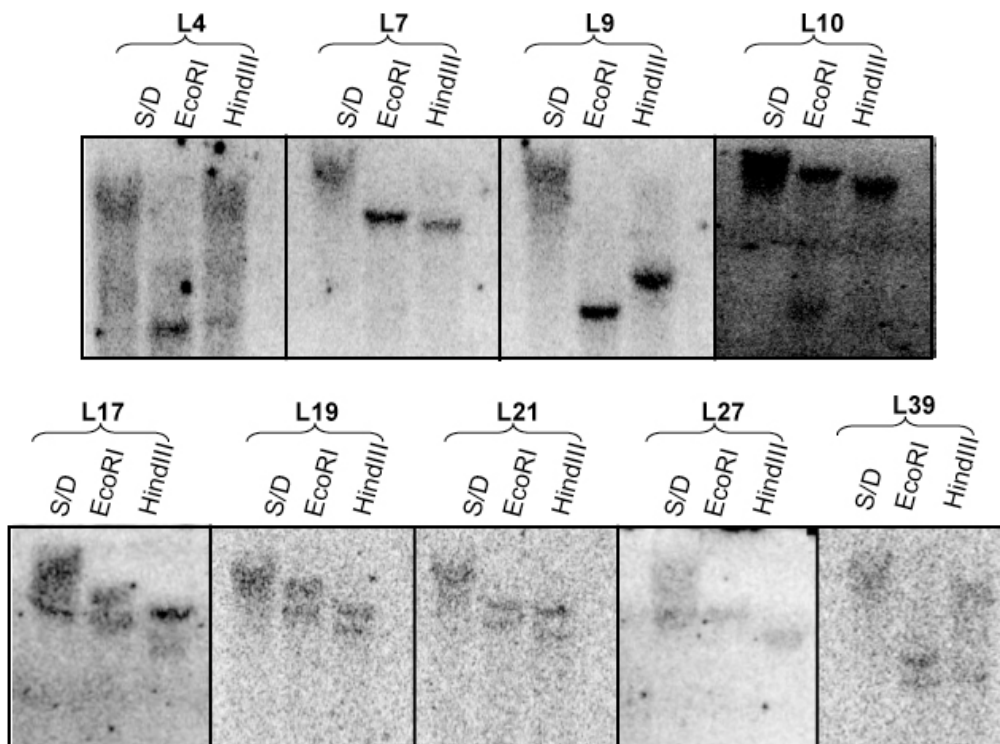
### **R1.1. Obtención de plantas homocigotas y mono-locus para el transgen.**

Se llevaron a cabo 5 experimentos independientes de transformación de cotiledones de tomate. En total se usaron aproximadamente 900 segmentos de cotiledones, a partir de los cuales se regeneraron 40 plantas con capacidad de crecer en presencia de 50 µg/ml higromicina. A partir de DNA genómico de todas las líneas T1 regeneradas se detectó por PCR el fragmento de 468 pb del gen de resistencia a higromicina en 36 de las 40 plantas regeneradas. De entre estas líneas se escogieron 10 al azar para estudios posteriores (Figura R1).



**Figura R1.** Detección por PCR de un fragmento del gen de resistencia a higromicina en plantas de tomate no transformadas (WT) y transformadas T1. Como control positivo se utilizó la construcción de sobreexpresión pCAMBIA1303-LeNHX2 (PC).

Los ensayos de *Southern blot* mostraron que de las 10 plantas T1 seleccionadas, únicamente las líneas L4, L7, L9 y L27 mostraban una única señal de hibridación con la sonda marcada, siendo dicha señal diferente cuando el DNA genómico había sido digerido con diferentes enzimas de restricción (Figura R2). Las plantas no transformadas no mostraron ninguna señal de hibridación (resultados no mostrados).



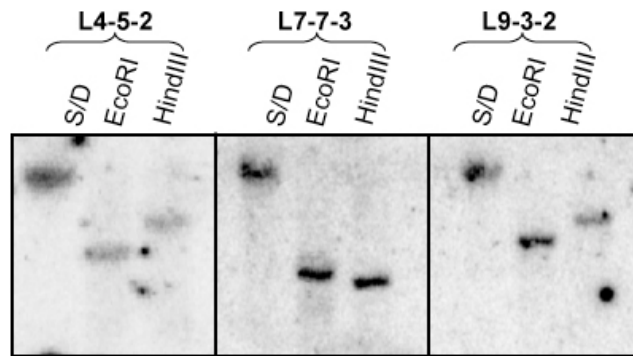
**Figura R2.** *Southern blot* de diferentes líneas transgénicas de tomate transformadas con la construcción pCAMBIA1303-LeNHX2.

Puesto que según estos análisis por *Southern blot* las líneas L4, L7, L9 y L27 son portadoras de una única inserción del transgén LeNHX2, se realizaron procesos de autofecundación de estas plantas T1 y se analizó la segregación del carácter resistencia a higromicina en los descendientes T2 y T3 a fin de seleccionar líneas homocigotas (Tabla R1).

**Tabla R1.** Porcentajes de germinación, en presencia de higromicina, de las semillas obtenidas de líneas transformantes T1 con una única inserción del transgén LeNHX2 y de las obtenidas de las líneas T2 y T3 generadas por autofecundación. Se emplearon 50 semillas en cada caso y los valores se refirieron a los porcentajes de germinación obtenidos en ausencia higromicina (100 %).

T1	Germinación (%)	T2	Germinación (%)	T3	Germinación (%)
4	83,3	4-5	95,0	4-5-2	100
7	77,8	7-7	93,8	7-7-3	100
9	80,3	9-3	95,9	9-3-2	100
27	83,9	27-3	90	-	-

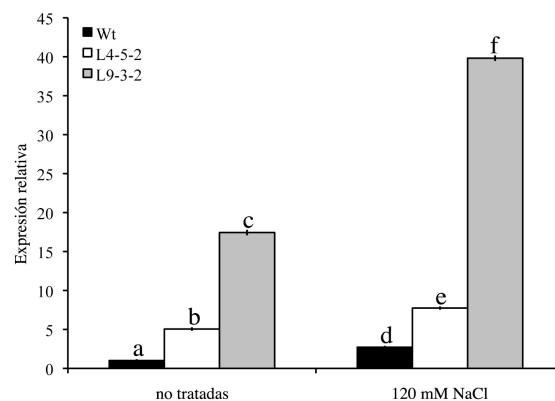
Los estudios de segregación de la resistencia a higromicina en las diferentes generaciones determinaron que las semillas de las líneas T3 4-5-2, 7-7-3 y 9-3-2, germinaban al 100 % en presencia del antibiótico y, por tanto, estas líneas se consideraron homocigotas. Además, se comprobó que estas líneas mantenían una única inserción del transgén LeNHX2 mediante experimentos de *Southern blot* (Figura R3). En el caso de la línea 27, las plantas T3 mostraron niveles anormalmente bajos de germinación de modo que fueron descartadas para los ensayos posteriores.



**Figura R3.** Southern blot de 3 líneas transgénicas T3 homocigotas para el transgen LeNHX2.

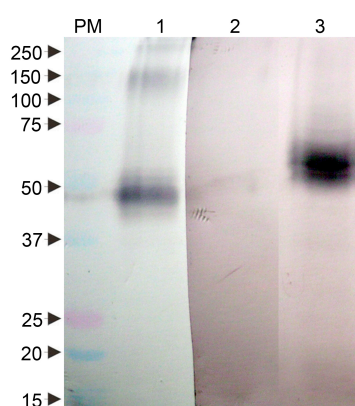
### R1.2. Determinación de los niveles de expresión de LeNHX2.

El análisis por PCR a tiempo real mostró que en condiciones control, donde las plantas no habían sido tratadas, los niveles de expresión de LeNHX2 en las raíces de las líneas transgénicas fueron mayores que los de las plantas no transformadas, e incrementaron en todas las plantas por efecto del tratamiento salino, siendo este aumento significativamente mayor en las plantas transgénicas (Figura R4).



**Figura R4.** Niveles de expresión relativa de LeNHX2, cuantificado por PCR a tiempo real, en las raíces de las plantas sin transformar (Wt) y en las de las líneas transgénicas T3 homocigotas 4-5-2 y 9-3-2. Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días en cultivo hidropónico. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a la expresión de LeNHX2 en plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

Además de comprobar la presencia del transgen LeNHX2 mediante análisis por PCR, se estudió la presencia de la proteína codificada por dicho transgen mediante inmunoblot utilizado anticuerpos frente a la cola de histidinas presente en el extremo C-terminal de la proteína (apartado M2.2.9). Estos estudios mostraron que el anticuerpo reconocía una proteína de aproximadamente 55 kD en microsomas aislados de raíces de plantas de la línea transgénica 9-3-2 y no así en los de líneas control (Figura R5). A efectos comparativos y como control positivo se incluyó en los experimentos de inmunodetección la proteína LeNHX2 purificada de microsomas de levadura transformada con una construcción para la expresión de este transportador de tomate.



**Figura R5.** Inmunodetección de LeNHX2 en membranas microsomales obtenidas de raíces de plantas no transformadas (2) y transgénica L4-5-2 (3). Plantas de 25 días se trataron con 120 mM NaCl durante 5 días en cultivo hidropónico. Como control se incluye la inmunodetección de LeNHX2 purificada de levadura transformada con este gen de tomate (1).

### **R1.3. Caracterización fisiológica de las plantas sobreexpresoras LeNHX2.**

El crecimiento de las plantas sobreexpresoras de LeNHX2 y las no transformadas se midió en base a la determinación del peso fresco de raíz y parte aérea y al cálculo del índice de crecimiento relativo (RGR). En ausencia de estrés salino no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de plantas

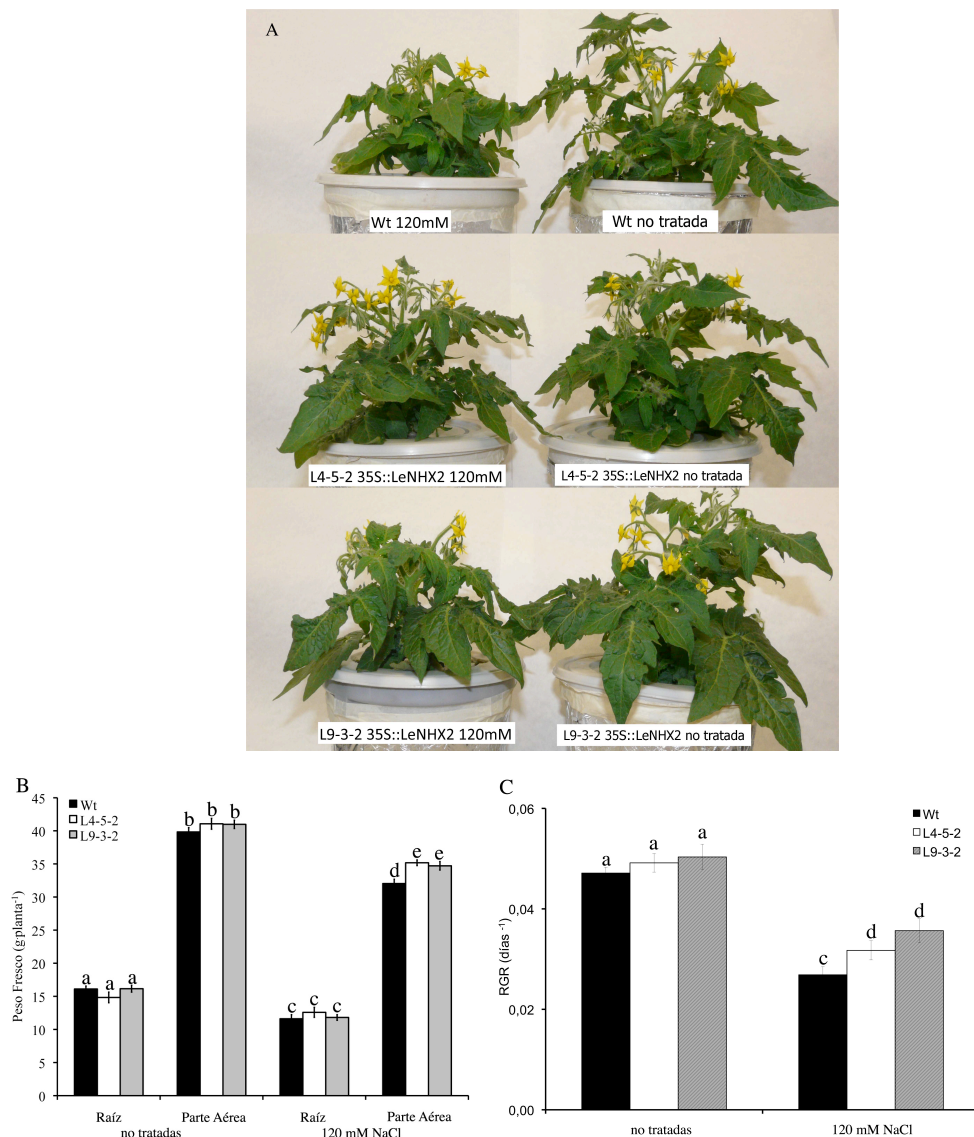
(Figura R6A). Sin embargo, el cultivo en presencia de 120 mM NaCl durante 15 días, afectó a los dos tipos de plantas, especialmente a las no transformadas, que presentaron menor tamaño que las plantas transgénicas, sobre todo en parte aérea. Este menor crecimiento venía asociado a un aumento del número de hojas cloróticas (Figura R6A). En presencia de 120 mM NaCl las plantas transgénicas presentaban un mayor peso fresco de la parte aérea que las no transformadas, no existiendo diferencias significativas en los pesos frescos de las raíces entre ambos tipos de plantas (Figura R6B). El análisis del RGR, calculado en función de los pesos secos, confirmó que las plantas transgénicas crecían mejor que las no transformadas en condiciones de estrés salino (Figura R6C).

Para estudiar el efecto de la baja disponibilidad de  $K^+$  sobre el crecimiento, las plantas fueron cultivadas en sistema hidropónico durante 35 días en ausencia de  $K^+$ . En estas condiciones las plantas transgénicas presentaron un menor crecimiento, especialmente en la parte aérea, que las plantas no transformadas (Figura R7A), lo cual se reflejó en una significativa disminución en el peso fresco de la parte aérea (Figura R7B).

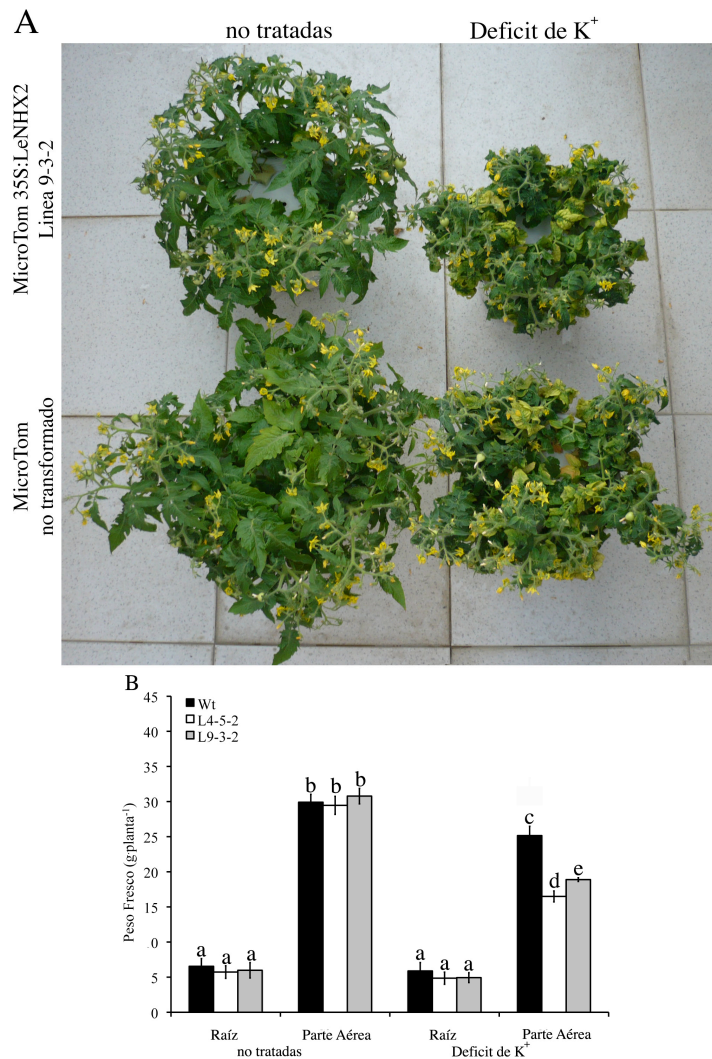
El análisis del contenido iónico se llevó a cabo con el material seco de tejidos de raíz y parte aérea después de 5 días de tratamiento con 120 mM de NaCl. En ausencia de tratamiento, tanto las plantas transgénicas como las no transformadas mostraron bajos contenidos de  $Na^+$ , mientras que en condiciones salinas ambos tipos de plantas acumularon cantidades similares de  $Na^+$  en la raíz, y sobre todo, en la parte aérea (Figura R8A). En el caso del  $K^+$ , en ausencia de tratamiento salino su contenido fue significativamente mayor en las raíces y parte aérea de las plantas transgénicas que en las de las plantas no transformadas. En presencia de NaCl, el contenido de  $K^+$  disminuyó drásticamente en todos los tejidos de ambos tipos de plantas, aunque las plantas transgénicas mostraron un mayor contenido de  $K^+$  en raíces y parte aérea que las plantas no transformadas (Figura R8B). Consiguientemente, las líneas sobreexpresoras de LeNHX2 mantuvieron, respecto a



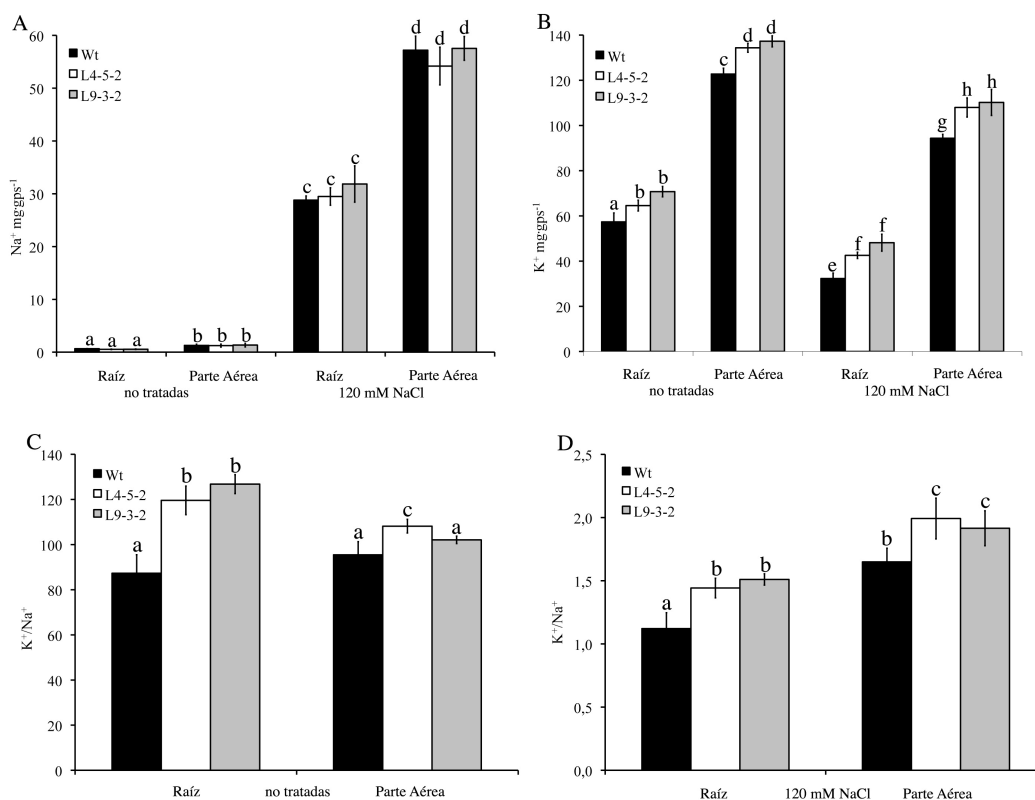
las plantas no transformadas, una mayor razón  $K^+/Na^+$  en raíz y parte aérea tanto si se cultivaban en ausencia (Figura R8C) como en presencia (Figura R8D) de NaCl.



**Figura R6.** Efecto del estrés salino sobre el crecimiento de plantas T3 sobreexpresoras de LeNHX2 (L4-5-2 y L9-3-2) y no transformadas (Wt). Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 15 días en cultivo hidropónico. A) Imagen representativa de un ensayo; B) Peso fresco de raíz y parte aérea expresado en gramos por planta a tiempo final; C) RGR (días<sup>-1</sup>), calculado en función del peso seco a los 5 y 15 días del inicio del tratamiento en el cultivo hidropónico. En todos los casos los valores son media  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes, con 4 réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

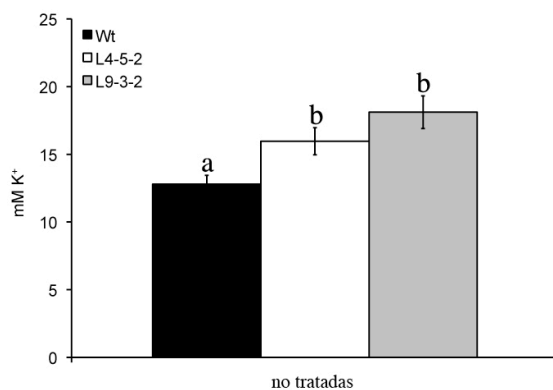


**Figura R7.** Crecimiento de plantas T3 sobreexpresoras de LeNHX2 (L4-5-2 y L9-3-2) y no transformadas (Wt). Plantas de 25 días se cultivaron en presencia (no tratadas) y ausencia de K<sup>+</sup> (déficit de K<sup>+</sup>) durante los 35 días del cultivo hidropónico. A) Imagen representativa de un ensayo; B) Peso fresco expresado en gramos por planta a tiempo final del cultivo. Los valores son media  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes, con 4 réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).



**Figura R8.** Contenido de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en raíces y parte aérea de plantas de tomate transgénicas (L4-5-2 y L9-3-2) y sin transformar (Wt). Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante los últimos 15 días del cultivo hidropónico. Se muestran los contenidos iónicos a los 5 días de tratamiento. A) Contenido de Na<sup>+</sup>; B) Contenido de K<sup>+</sup>; C) Relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en plantas no tratadas; D) Relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en plantas tratadas. Los resultados son media  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes, con cuatro réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan P < 0,05).

Las plantas transgénicas, cultivadas en condiciones normales de K<sup>+</sup>, mostraron un aumento del contenido en K<sup>+</sup> en el flujo xilemático comparado con las plantas sin transformar (Figura R9).



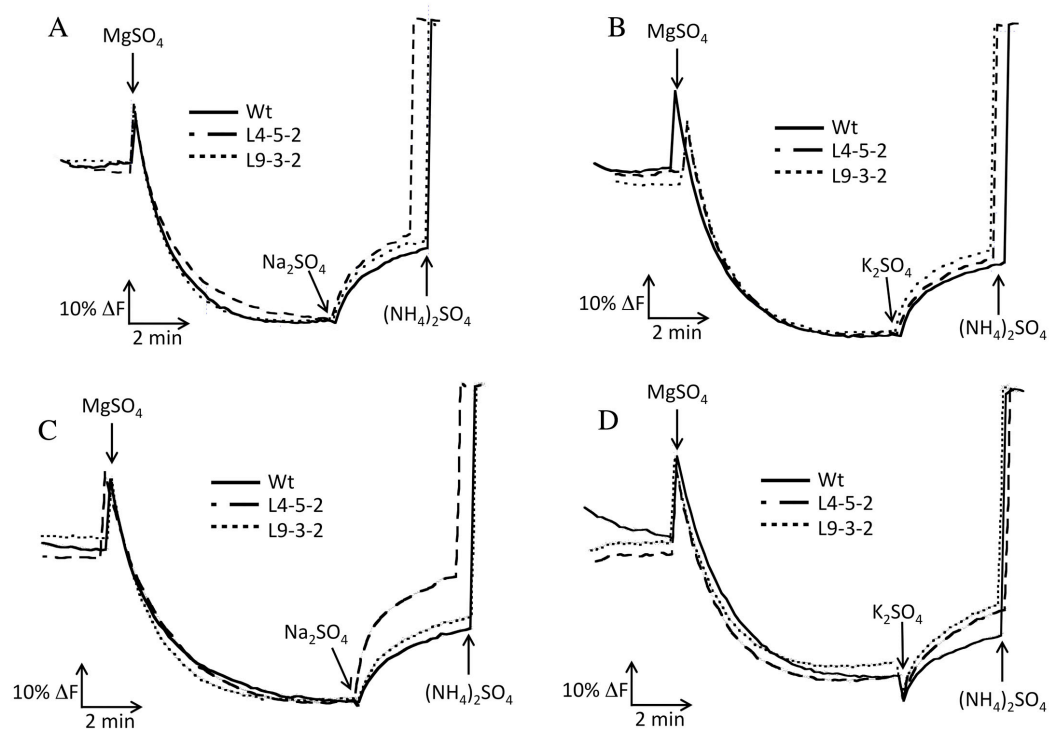
**Figura R9.** Contenido en  $K^+$  en el flujo xilemático en las plantas sin transformar y en las líneas transgénicas 4-5-2 y 9-3-2. Plantas de 25 días se cultivaron en condiciones normales de  $K^+$  durante 5 días en cultivo hidropónico. Los valores son media  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes, con 4 réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

#### **R1.4. Determinación de las actividades de transporte iónico en endomembranas.**

Con el fin de determinar si el aumento de los niveles de expresión de LeNHX2 y el incremento del contenido de  $K^+$  en las plantas transgénicas se correlacionaba con un aumento en la actividad de intercambio cation/ $H^+$  en endosomas, se realizaron ensayos de la actividad antiporte ( $K^+$ ,  $Na^+$ )/ $H^+$  (apartado M2.2.6) en fracciones enriquecidas en vesículas endomembranarias obtenidas a partir de raíces de plantas transgénicas y no transformadas (apartado M2.2.2) cultivadas en sistema hidropónico durante 8 días y tratadas con 120 mM NaCl durante los 5 últimos días. Para ello, se midió la relajación del gradiente de pH previamente creado en el interior de las vesículas por la  $V-H^+$ -ATPasa tras la adición de  $Na_2SO_4$  o  $K_2SO_4$  al medio de incubación, determinado como recuperación de la fluorescencia de la sonda ACMA sensible a pH (apartado M2.2.6).

En condiciones control, la actividad de intercambio  $Na^+/H^+$  y  $K^+/H^+$  fue ligeramente más alta en las líneas transgénicas que en las no transformadas (Figuras R10A, B). Cuando las plantas se cultivaron en presencia de NaCl, tanto la actividad antiportadora  $Na^+/H^+$  como  $K^+/H^+$  fueron significativamente más altas en las líneas

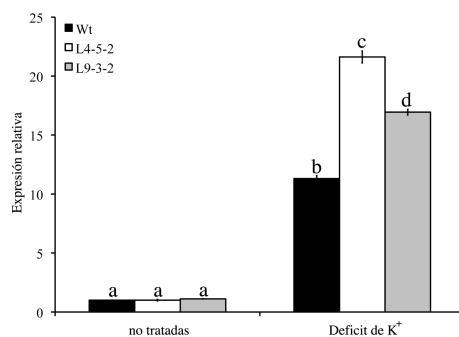
transgénicas que en las plantas no transformadas a las concentraciones de sales ensayadas (Figura R10C, D).



**Figura R10.** Actividad antiportadora Cation/ $H^+$  en fracciones enriquecidas en vesículas endomembranarias de raíces de plantas no transformadas (línea continua) y transgénicas (líneas discontinuas) cultivadas en ausencia (A y B) y presencia (C y D) de 120 mM NaCl durante 5 días. La actividad fue determinada mediante la extinción de la fluorescencia del ACMA. Inicialmente, tras la adición de  $MgSO_4$  se genera un gradiente de pH a través de las vesículas, ácido en el interior, energizado por la  $V-H^+-ATPasa$ . Una vez el gradiente de pH es estable, la actividad de intercambio  $Na^+/H^+$  o  $K^+/H^+$  se inicia por adición de (A y C)  $Na_2SO_4$  (50 mM) o (B y D)  $K_2SO_4$  (50 mM), respectivamente. Finalmente, se suprime el gradiente de pH por adición de 12,5 mM  $(NH_4)_2SO_4$ . Las gráficas corresponden a un experimento representativo de tres realizados usando preparaciones de membrana independientes para cada tipo de planta. La recuperación de la fluorescencia se normalizó de forma que 0 % representa el nivel mínimo de fluorescencia (extinción máxima de la fluorescencia) obtenido después de la energización de la  $V-H^+-ATPasa$ , y 100 % representa el nivel máximo de fluorescencia obtenido después de la adición de ionóforos (recuperación máxima de la fluorescencia).

### R1.5. Regulación de la expresión de los sistemas de absorción de $K^+$ de alta afinidad, HAK, en las plantas sobrepresoras LeNHX2.

La mayor actividad antiportadora  $K^+/H^+$  en endosomas de las plantas que sobrepresan LeNHX2 se realiza a expensas del  $K^+$  citosólico y, por tanto, podría generar un déficit de  $K^+$  en el citosol, que disparara la inducción de sistemas de absorción de alta afinidad específicos para  $K^+$ , capaces de absorber  $K^+$  del medio extracelular hacia el citosol. Uno de los mecanismos implicados en la absorción de  $K^+$  por las raíces de las plantas de tomate es el transportador de  $K^+$  de alta afinidad, LeHAK5 (Nieves-Cordones et al., 2007 y 2008). De ahí que se analizara el efecto de la sobreexpresión de LeNHX2 sobre los niveles de expresión de LeHAK5 en las raíces de las plantas. Como puede observarse en la Figura R11, en presencia de  $K^+$  y ausencia de un estrés salino, las plantas no transformadas y transgénicas mostraron niveles de expresión muy bajos de HAK5, no observándose además diferencias significativas entre ambos tipos de plantas. La ausencia de  $K^+$  en el medio de cultivo indujo un incremento considerable en los niveles de expresión de HAK5 tanto en las plantas transgénicas como en las no transformadas, siendo dicho incremento significativamente más alto en las plantas transgénicas (Figura R11).



**Figura R11.** Niveles de expresión relativa de LeHAK5, cuantificado por PCR a tiempo real, en las raíces de las plantas sin transformar (Wt) y de las líneas transgénicas T3 4-5-2 y 9-3-2. Plantas de 25 días se cultivaron en presencia (no tratadas) y ausencia (déficit de  $K^+$ ) de  $K^+$  durante los últimos 7 días del cultivo hidropónico. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a la expresión de LeHAK5 en raíces de plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

## R2. Sobreexpresión de SISOS2 en tomate.

### R2.1. Obtención de plantas homocigotas y mono-locus para el transgen.

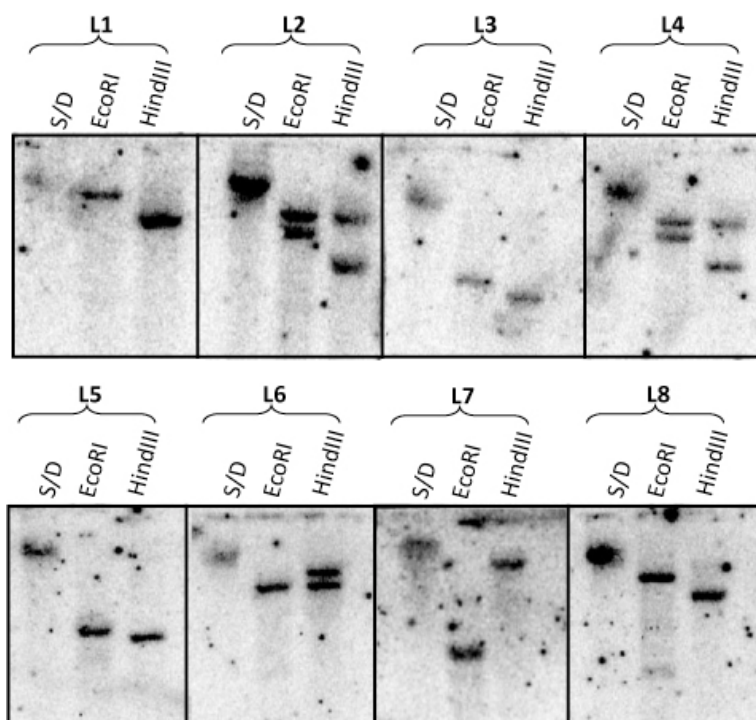
Se llevaron a cabo 2 experimentos independientes de transformación de cotiledones de tomate. En total se usaron aproximadamente 450 segmentos de cotiledones, a partir de los cuales se regeneraron 29 plantas que crecían en medios selectivos conteniendo 50 µg/ml higromicina. Se extrajo DNA genómico de todas las líneas T1 y mediante PCR se detectó el fragmento de 468 pb del gen de resistencia a higromicina en todas las plantas regeneradas. De entre las líneas T1 en las que amplificó por PCR el fragmento de resistencia a higromicina se escogieron 8 al azar para estudios posteriores (Figura R12).



**Figura R12.** Detección por PCR de un fragmento del gen de resistencia a higromicina en plantas de tomate no transformadas (Wt) y transformadas T1 de las líneas L1 a L8. Como control positivo se utilizó la construcción de sobreexpresión pCAMBIA1303-SISOS2 (PC).

Los ensayos de *Southern blot* mostraron que las líneas T1 1, 3, 5, 7 y 8, pero no las líneas 2, 4 y 6 presentaban una única banda de hibridación con la sonda marcada y que además, dicha señal era diferente cuando el DNA genómico había sido digerido con diferentes enzimas de restricción (Figura R13), de lo cual se concluye que las líneas 1, 3, 5, 7 y 8 eran portadoras de una única inserción del transgen. Las plantas no transformadas no mostraron ninguna señal de hibridación (resultados no mostrados).

Las líneas T1 con una única inserción se utilizaron para obtener por autofecundación plantas T2 (Tabla R2).



**Figura R13.** *Southern blot* de diferentes líneas transgénicas de tomate transformadas con la construcción pCAMBIA1303-SISOS2.

**Tabla R2.** Porcentajes de germinación, en presencia de higromicina, de las líneas transformantes T1 con una única inserción del transgen SISOS2 y de las líneas T2 obtenidas por autofecundación. Para cada una de las determinaciones se emplearon 50 semillas. Los valores están referidos a los porcentajes de germinación obtenidos en ausencia higromicina (100 %).

T1	Germinación (%)	T2	Germinación (%)
1	65	1-1	90
3	77	3-2	94
5	70	5-4	96
7	80	7-4	94
8	77	8-2	93

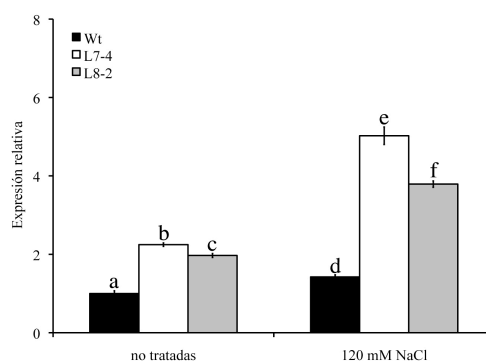
Los ensayos de segregación de la resistencia a higromicina en las diferentes generaciones determinaron que las semillas de las líneas T2 1-1, 5-4, 7-4 y 8-2



mostraban porcentajes de germinación superiores al 90 % en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  higromicina. Se decidió emplear estas líneas T2 para los ensayos posteriores.

## R2.2. Determinación de los niveles de expresión de SISOS2.

El análisis por PCR a tiempo real mostró que en condiciones control los niveles de expresión de SISOS2 en las raíces de las plantas transgénicas eran significativamente mayores que los de las plantas sin transformar (Figura R14). Asimismo, cuando las plantas se sometieron a un estrés salino, los transcritos de SISOS2 aumentaron en las raíces de todas las plantas, siendo este aumento significativamente mayor en las plantas transgénicas (Figura R14).

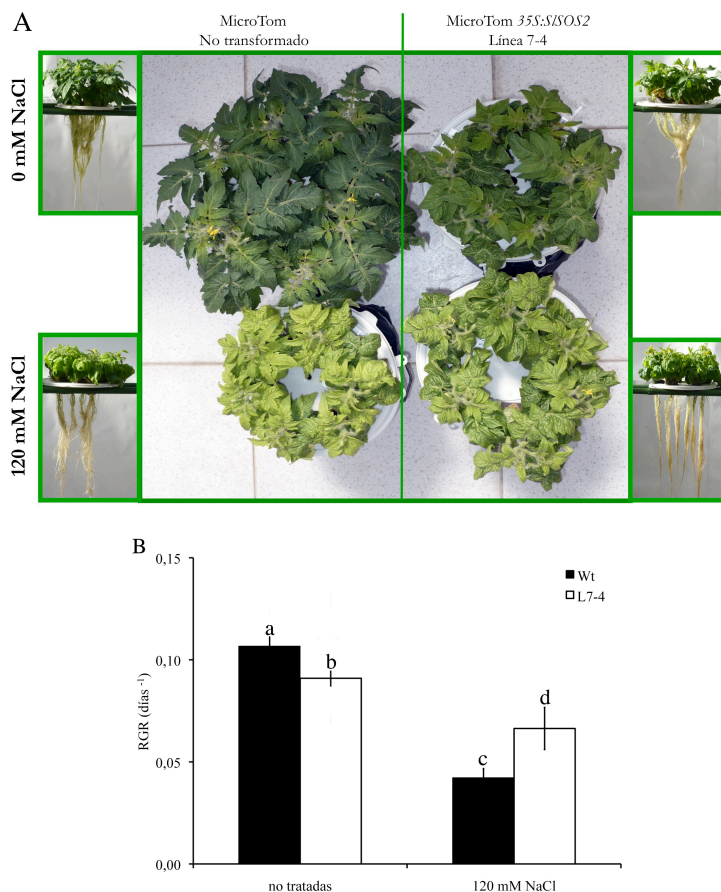


**Figura R14.** Niveles de expresión relativa de SISOS2, cuantificado por PCR a tiempo real, en las raíces de plantas sin transformar (Wt) y en las de las líneas transgénicas T2 7-4 y 8-2. Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a la expresión de SISOS2 en plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

## R2.3. Caracterización fisiológica de las plantas sobreexpresoras SISOS2.

Ensayos preliminares llevados a cabo con plantas de la línea transgénica T2 L7-4 mostraron que en condiciones control eran más pequeñas que las plantas no transformadas. Cuando ambos tipos de plantas fueron cultivadas durante 10 días en presencia de 120 mM NaCl, las no transformadas presentaron un menor tamaño,

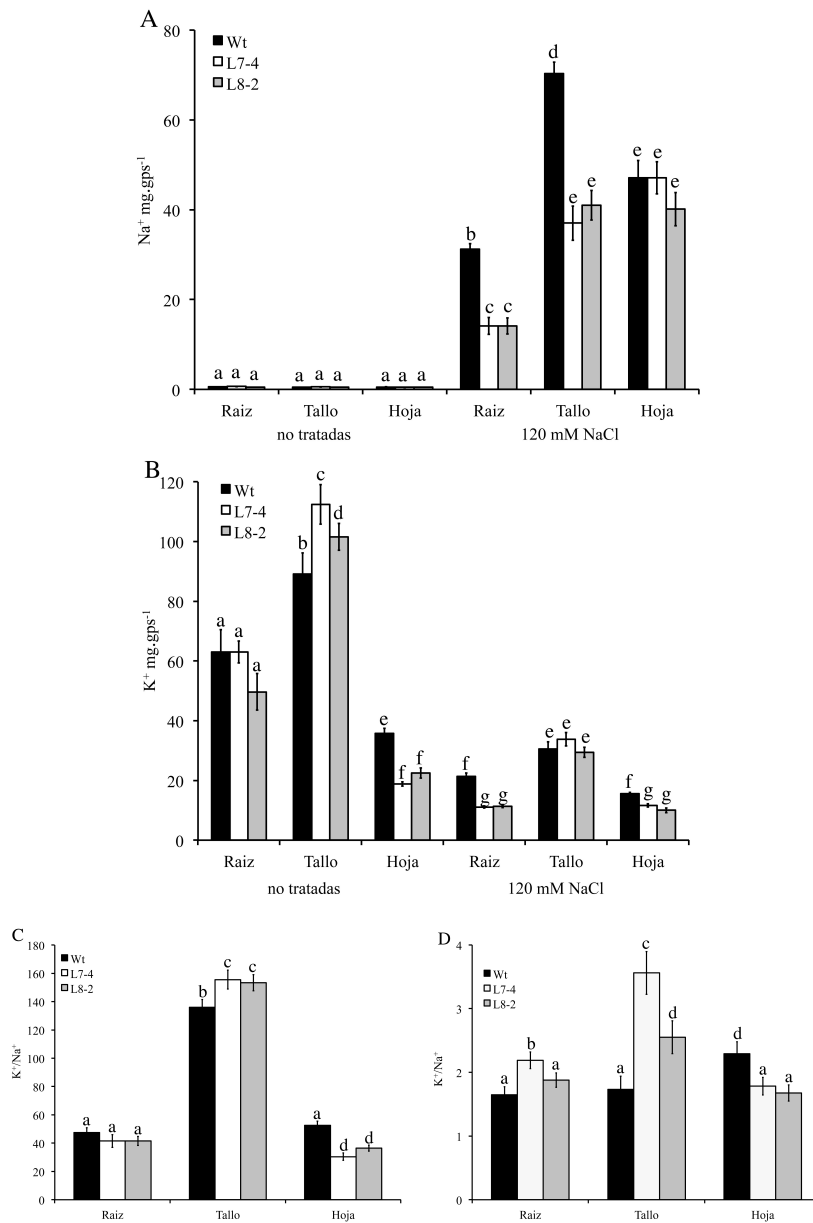
especialmente de la parte aérea, así como un mayor número de hojas cloróticas que las plantas transgénicas (Figura R15A). En concordancia con ello, el análisis del RGR mostró que las plantas transgénicas cultivadas en condiciones control presentaban un valor inferior al de las plantas sin transformar; mientras que en condiciones de estrés salino, el RGR de las plantas transgénicas era significativamente mayor que el de las plantas no transformadas, confirmando que las plantas transgénicas estaban mejor adaptadas al estrés por NaCl (Figura R15B).



**Figura R15.** Efecto del estrés salino sobre el crecimiento de plantas de tomate transgénicas T2 (línea 7-4), y no transformadas (Wt). Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 10 días en cultivo hidropónico. A) Imagen de un experimento representativo B) RGR (días<sup>-1</sup>), calculado a partir de peso seco de planta completa a los 5 y 10 días de tratamiento. Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes, con 3 réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

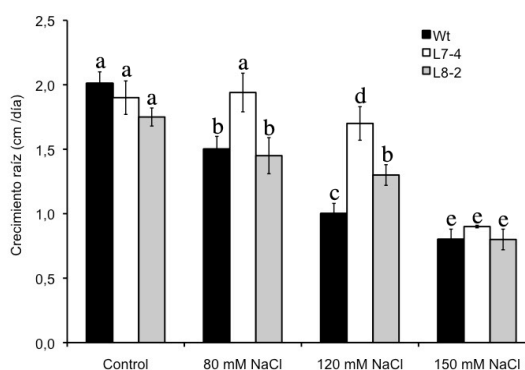
El análisis del contenido iónico en el material seco de raíz, tallo y hojas no mostró diferencias en el contenido de  $\text{Na}^+$  en condiciones control entre las plantas transgénicas y las no transformadas. Cuando las plantas se cultivaron en presencia de  $\text{NaCl}$ , todas ellas acumularon más  $\text{Na}^+$  en todos los tejidos estudiados, pero dicha acumulación fue mucho menor en el tallo y en la raíz de las plantas transgénicas que en las no transformadas (Figura R16A). Sin embargo, el efecto de la sobreexpresión de SISOS2 sobre el contenido de  $\text{K}^+$  fue menos consistente, si bien las plantas transgénicas mostraron una mejor relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en el tallo y en las hojas comparado con las plantas sin transformar (Figura R16C).

El fenotipo de las plantas sobreexpresoras de SISOS2 se analizó en estadios jóvenes de desarrollo durante los primeros días en placa Petri, y por consiguiente, en ausencia de transpiración.



**Figura R16.** Contenido en Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en raíces, tallos y hojas de plantas de tomate transgénicas T2 (L7-4 y L8-2) y sin transformar (Wt). Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 10 días de cultivo hidropónico. Se muestran los resultados de contenido iónico a los 5 días de tratamiento. A) Contenido en Na<sup>+</sup>; B) Contenido en K<sup>+</sup>; C) Relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en plantas no tratadas; D) Relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en plantas tratadas. Los resultados son media ± desviación estándar de 2 experimentos independientes, con cuatro réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan P<0,05).

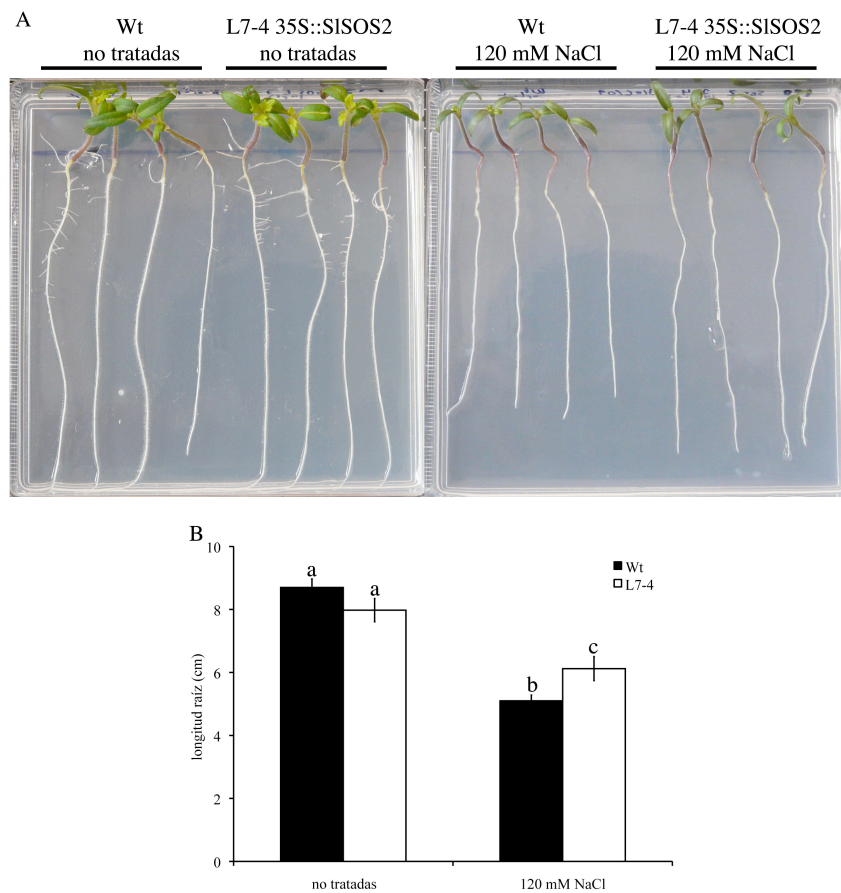
Para realizar estos ensayos, semillas germinadas en placa con 1,5 cm de radícula fueron transferidas a medio MG suplementado con 0 (Control), 80, 120 y 150 mM NaCl durante 0, 3 y 5 días, determinándose la longitud de sus raíces primarias (Figura R17). Debido a que las raíces presentaban crecimiento lineal, se pudo calcular la velocidad de crecimiento relativo de la raíz principal a lo largo del tiempo (apartado M1.2.10). Los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento relativo de la raíz de las plántulas transgénicas, en condiciones control, no difería significativamente del de las plantas no transformadas. En presencia de 80 mM NaCl las plántulas de la línea 7-4 mostraban una mayor velocidad de crecimiento relativo de la raíz primaria que las plántulas sin transformar y que las plántulas de la línea T2 8-2, mientras que en presencia de 120 mM NaCl las dos líneas transgénicas mostraban claramente una mayor velocidad de crecimiento relativo de la raíz que las plántulas sin transformar. A 150 mM NaCl, las plántulas no transformadas y transgénicas sufrieron de forma similar el efecto inhibitorio del estrés salino (Figura R17).



**Figura R17.** Crecimiento de la raíz primaria de plántulas procedentes de semillas T2 transgénicas y no transformadas cultivadas en placas Petri durante 5 días. Se determinó la velocidad de crecimiento de la raíz a lo largo del tiempo. Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes, con 4 réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

En base a los resultados obtenidos, se decidió el empleo de 120 mM NaCl para futuros ensayos en relación al efecto positivo de la sobreexpresión de SISOS2 en el

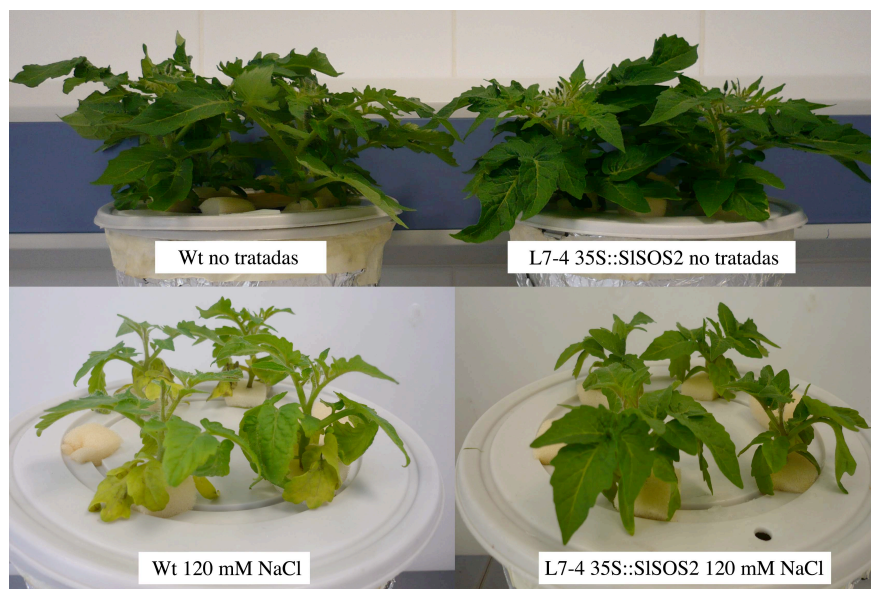
crecimiento de las plántulas bajo condiciones salinas (Figura R18).



**Figura R18.** Cultivo en placa Petri de líneas transgénicas T2 sobreexpresoras de SISOS2 (L7-4) y no transformadas (Wt). A) Imagen de plántulas crecidas durante 5 días en presencia de 0 (Control) y 120 mM NaCl. B) Longitud de la raíz principal de las plántulas cultivadas en A. Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes, con 3 réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

Las plántulas cultivadas en placa Petri durante 5 días en presencia de 0 (no tratadas) o 120 mM NaCl se transfirieron a cultivo hidropónico suplementando la solución nutritiva con la misma concentración de NaCl del medio de cultivo en placa. Ello permitió el seguimiento de las plantas en estadios posteriores de crecimiento y en condiciones fisiológicas de transpiración. Como se puede apreciar en la figura R19, cuando las plantas fueron cultivadas en condiciones control, no se apreciaron

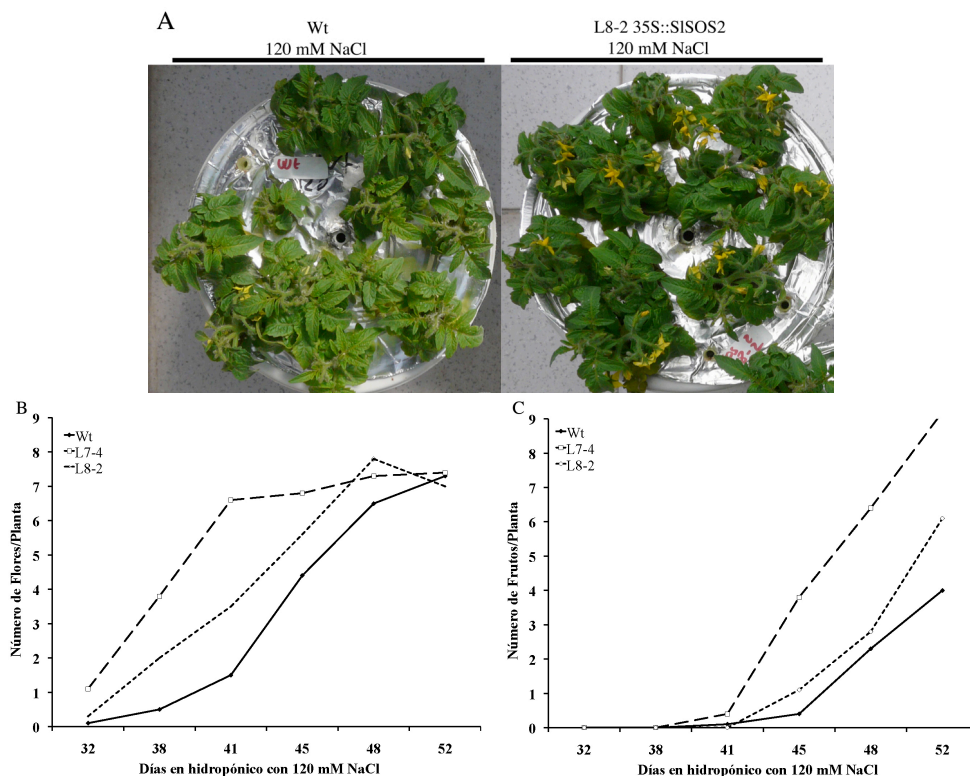
diferencias entre las plantas no transformadas y las transgénicas. Sin embargo, en presencia de 120 mM NaCl, las plantas no transformadas mostraron clorosis y marchitamiento, siendo este efecto más llamativo en las hojas más viejas de la planta. Las plantas transgénicas mostraron estos mismos síntomas, pero mucho menos acusados.



**Figura R19.** Cultivo hidropónico de plantas sobreexpresoras de SISOS2 (L7-4) y no transformadas (Wt). Plántulas de 5 días, cultivadas en placa Petri, se cultivaron en ausencia (no tratadas) y presencia de 120 mM NaCl durante los 30 días del cultivo hidropónico. Se muestra la imagen a 14 días del cultivo.

Utilizando estos cultivos hidropónicos, iniciados de plántulas cultivadas en placa Petri, y prolongados hasta producción de frutos, se demostró que las plantas transgénicas tratadas con 120 mM de NaCl iniciaban la floración aproximadamente 32 días después de ser transferidas a cultivo hidropónico, mientras que las plantas no transformadas cultivadas en las mismas condiciones retrasaban la floración aproximadamente una semana con respecto a las líneas transgénicas (Figura R20A). Además del adelanto en la floración, las plantas transgénicas presentaron una mayor producción de flores bajo condiciones salinas (Figura R20B), lo que se reflejó

también en una mayor producción de frutos con respecto a las plantas no transformadas (Figura 20C).



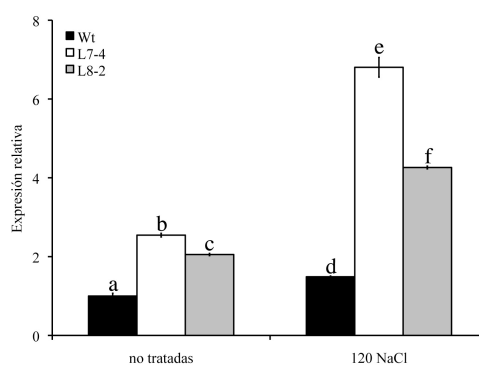
**Figura R20.** A) Cultivo hidropónico de plantas sobreexpresoras de SISOS2 L8-2 y no transformadas (Wt) iniciados del plántulas cultivadas en placa Petri. B) Producción de flores por planta a lo largo del tiempo. C) Producción de frutos por planta a lo largo del tiempo.

#### R2.4. Regulación de la expresión de SISOS1, LeNHX2 y LeNHX4 en las plantas sobreexpresoras de SISOS2.

Como se ha indicado en los antecedentes científicos de este trabajo, SOS2 es una proteína quinasa que forma parte de la ruta de señalización SOS, descrita por primera vez en *Arabidopsis*. Esta ruta está además integrada por las proteínas SOS1 y SOS3. SOS3 es un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se une físicamente y activa a SOS2, provocando el complejo SOS3-SOS2 la activación del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática, SOS1 (Zhu, 2002). En este trabajo se evaluó si la



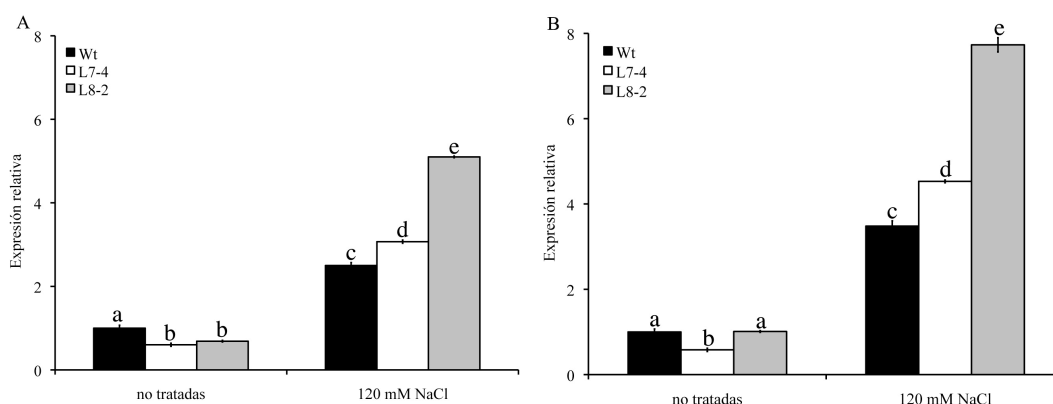
sobreexpresión de SISOS2 en las plantas transgénicas de tomate, inducía la expresión de SISOS1, diana final de la ruta SOS. Para ello se analizó el nivel de expresión de SISOS1 mediante PCR a tiempo real. Como puede observarse en la figura R21, en ausencia del estrés salino, las plantas transgénicas presentaban una mayor expresión relativa de SISOS1 que, además, aumentaba significativamente cuando las plantas se sometían a estrés salino.



**Figura R21.** Niveles de expresión relativa de SISOS1, cuantificado por PCR a tiempo real, en las raíces de plantas sin transformar (Wt) y en las de las líneas transgénicas T2 7-4 y 8-2 que sobreexpresan SISOS2. Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a la expresión de SISOS1 en plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

En *Arabidopsis* se ha descrito que SOS2 podría interactuar, de forma independiente de SOS3, con otras proteínas que no forman parte de la ruta SOS, como la  $H^+$ -ATPasa vacuolar, el antiportador  $Ca^{2+}/H^+$ , CAX1 o antiportadores  $Na^+/H^+$  de la familia NHX, concretamente NHX1 (Cheng et al., 2004, Qiu et al., 2004, Batelli et al., 2007). Dichas interacciones reforzarían el papel de AtSOS2 como nodo de señalización en el control de la homeostasis de  $Na^+$  y en la adaptación al estrés salino. Por ello, también analizamos si la sobreexpresión de SISOS2 en las líneas transgénicas afectaba a los niveles de expresión de algunos de los miembros de la familia LeNHX de tomate caracterizados en nuestro laboratorio (Venema et al., 2003; Rodríguez-Rosales et al., 2008; Gálvez, 2009).

Los datos obtenidos por PCR a tiempo real mostraron que, en condiciones control, los niveles de expresión de LeNHX2 en las raíces de las plantas transgénicas fueron similares que los de las plantas no transformadas, mientras que en condiciones de estrés salino, las raíces de las plantas transgénicas mostraban una mayor expresión de LeNHX2 que las plantas sin transformar (Figura R22A). En el caso de LeNHX4, mientras que en ausencia de estrés los niveles de expresión de este gen en las raíces de las plantas sobrepresoras de SISOS2 eran equivalentes a los mostrados por las plantas no transformadas, en presencia del estrés salino, las raíces de las plantas transgénicas presentaban niveles de expresión de LeNHX4 significativamente mayores que el mostrado por las plantas sin transformar (Figura R22B).



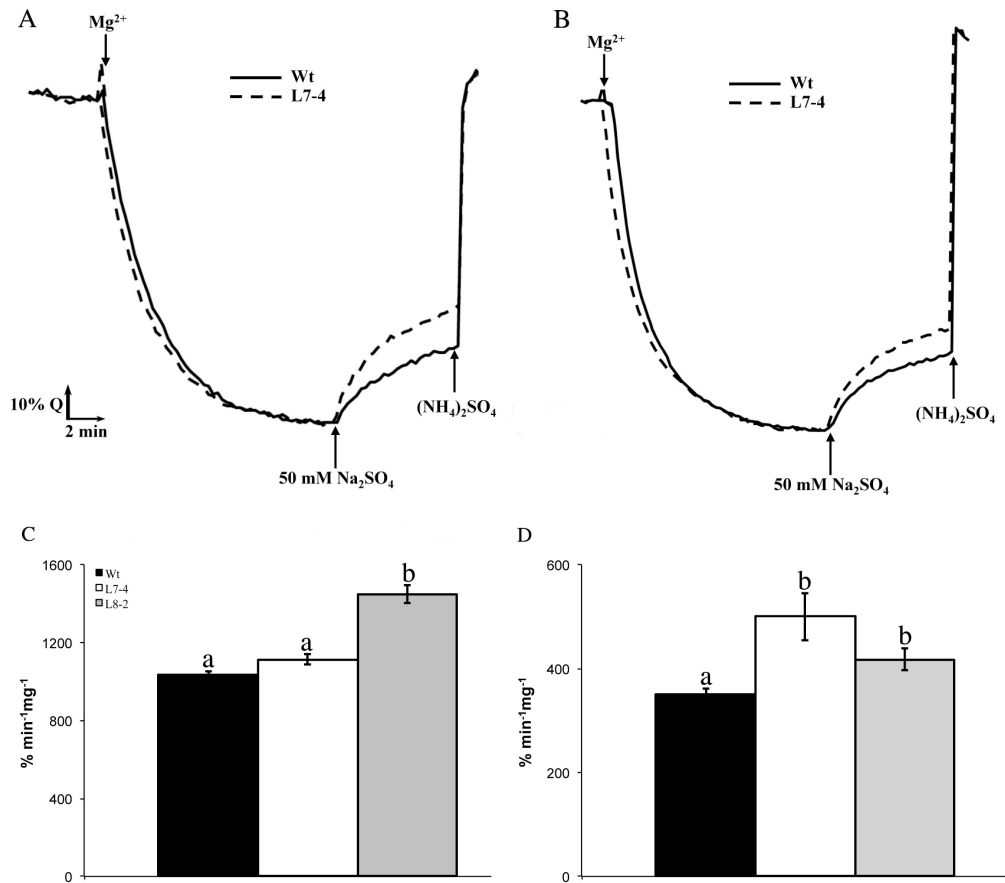
**Figura R22.** Niveles de expresión relativa de LeNHX2 (A) y LeNHX4 (B), cuantificado por PCR a tiempo real, en las raíces de las plantas sin transformar (Wt) y en las de las líneas transgénicas T2 L7-4 y L8-2. Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a la expresión de LeNHX2 o LeNHX4 en plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan P<0,05).

### R2.5. Determinación de las actividades de transporte iónico en tonoplasto y membrana plasmática en plantas sobrepresoras de SISOS2.

Con el fin de corroborar que el aumento en los niveles de expresión de SISOS1 se correlacionaba con un incremento en la actividad de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en el plasmalema de la raíz, se realizaron ensayos de la actividad antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$

(apartado M2.2.6) en vesículas de membrana plasmática purificadas de raíces de plantas de tomate (apartado M2.2.3) que sobreexpresan SISOS2 y de plantas no transformadas, cultivadas en sistema hidropónico y tratadas con 120 mM NaCl durante 5 días. Para ello, se midió la relajación del gradiente de pH previamente creado en el interior de las vesículas por la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema, tras la adición de  $Na_2SO_4$  al medio de incubación, determinado como recuperación de la fluorescencia de la sonda ACMA sensible a pH. Se observó que tras la adición de  $Na_2SO_4$ , las actividades de intercambio  $Na^+/H^+$  fueron más altas en las plantas transgénicas que en las plantas sin transformar (Figura R23A).

Puesto que la sobreexpresión de SISOS2 en tomate induce la expresión del antiportador vacuolar LeNHX4 en condiciones de estrés salino (Figura R22B), en este trabajo se estudió también la actividad antiportadora  $Na^+/H^+$  en membrana vacuolar. Para ello se aislaron vesículas enriquecidas en tonoplasto de raíces de plantas de tomate (apartado M2.2.4) que sobreexpresan SISOS2 y de plantas no transformadas cultivadas en presencia de 120 mM NaCl, observándose una mayor actividad de intercambio  $Na^+/H^+$  en el tonoplasto de las plantas transgénicas (Figura R23B).

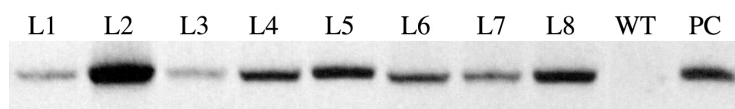


**Figura R23.** Actividad antiportadora Na/H<sup>+</sup> en fracciones enriquecidas en vesículas de plasmalema (A) y tonoplasto (B) de raíces de plantas no transformadas (línea continua) y transgénica (línea discontinua), cultivadas en presencia de 120 mM NaCl durante 5 días, y determinada mediante la extinción de la fluorescencia del ACMA. Se representa también el transporte de H<sup>+</sup> en cada fracción membranal, plasmalema (C) y tonoplasto (D). Inicialmente, tras la adición de MgSO<sub>4</sub> se genera un gradiente de pH a través de las vesículas, ácido en el interior, energizado por la H<sup>+</sup>-ATPasa. Una vez el gradiente de pH es estable, la actividad de intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> se inicia por adición de 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Finalmente, se suprime el gradiente de pH por adición de 12,5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las gráficas corresponden a un experimento representativo de los dos realizados usando preparaciones de membrana independientes para cada uno de ellos. La recuperación de la fluorescencia se normalizó de forma que 0 % representa el nivel mínimo de fluorescencia (extinción máxima de la fluorescencia) obtenido después de la energización de la V-ATPasa, y 100 % representa el nivel máximo de fluorescencia obtenido después de la adición de ionóforos (recuperación máxima de la fluorescencia).

### R3. Sobreexpresión de SISOS3 en tomate.

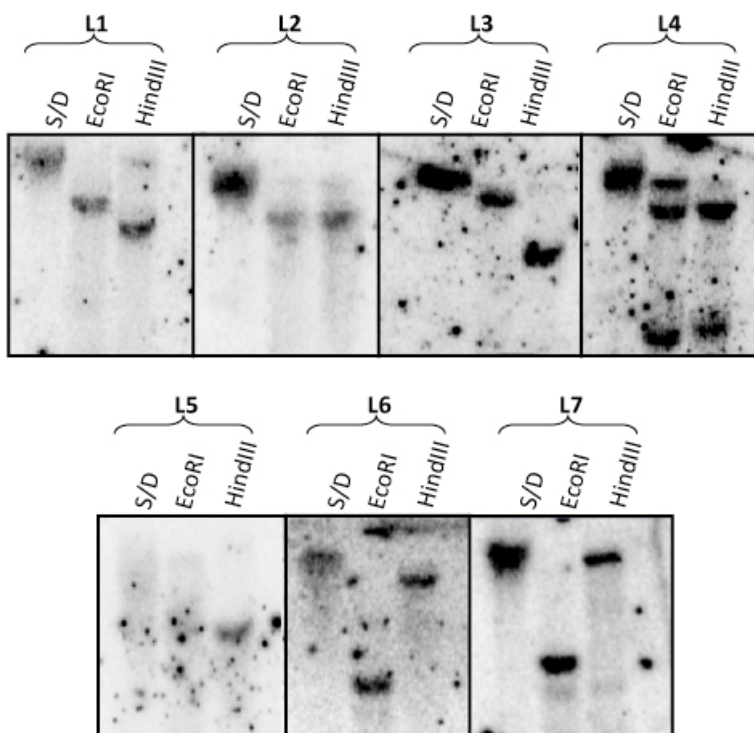
#### R3.1. Obtención de plantas homocigotas y mono-locus para el transgen.

Se llevaron a cabo 4 experimentos independientes de transformación de cotiledones de tomate. En total, se usaron para la transformación aproximadamente 1000 segmentos de cotiledones, a partir de los cuales se regeneraron 20 plantas T1 que crecían en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  higromicina. Se extrajo DNA genómico y mediante PCR se detectó la presencia del fragmento de 468 pb del gen de resistencia a higromicina en todas las líneas regeneradas, de las cuales se escogieron 8 para estudios posteriores (Figura R24).



**Figura R24.** Detección por PCR de un fragmento del gen de resistencia a higromicina en plantas de tomate no transformadas (Wt) y en 8 líneas transgénicas independientes. Como control positivo se utilizó la construcción de sobreexpresión pCAMBIA1303-SISOS3 (PC).

Los ensayos de *Southern blot* revelaron que de las 8 líneas transgénicas T1, solamente las líneas 1, 2, 3, 5 y 6 mostraron un único lugar de hibridación con la sonda (Figura R25), de modo que estas líneas se consideraron portadoras de una única inserción del transgen SISOS3. Las plantas que no habían sido transformadas no mostraron ninguna señal de hibridación (datos no mostrados).



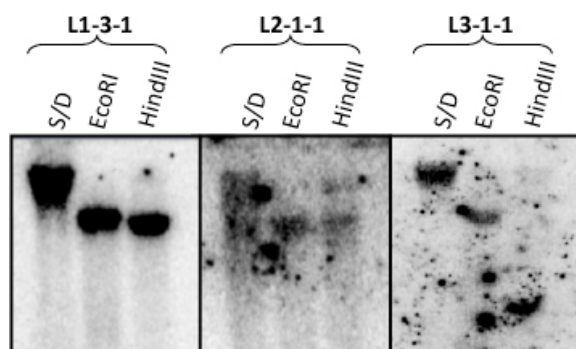
**Figura R25.** Southern blot de diferentes líneas transgénicas de tomate transformadas con la construcción pCAMBIA1303-SISOS3.

A partir de las plantas de las líneas T1 con una sola inserción se realizaron sucesivas autofecundaciones hasta obtener líneas homocigotas T3 (Tabla R3).

**Tabla R3.** Porcentajes de germinación, en presencia de higromicina, de semillas de las líneas transformantes T1 con una única inserción del transgen SISOS3 y de semillas de las líneas T2 y T3 obtenidas por autofecundación. Para cada una de las determinaciones se emplearon 50 semillas. Los valores están referidos a los porcentajes de germinación obtenidos en ausencia higromicina, que se consideró 100 %.

T1	Germinación (%)	T2	Germinación (%)	T3	Germinación (%)
1	76	1-3	95,0	1-3-1	100
2	77,8	2-1	93,8	2-1-1	100
3	67	3-1	95,9	3-1-1	100

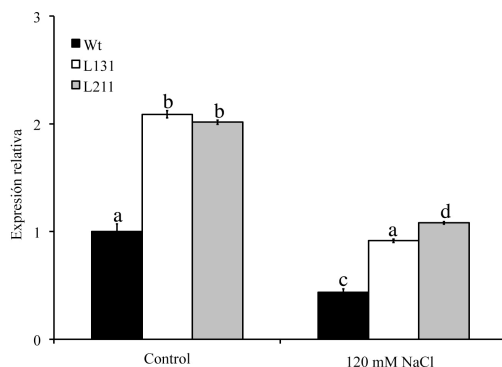
Las semillas obtenidas de las líneas 1-3-1, 2-1-1 y 3-1-1, presentaron un 100 % de germinación en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  higromicina, y se consideraron líneas T3 homocigotas, que además, mantenían una única inserción del transgen (Figura R26).



**Figura R26.** *Southern blot* de 3 líneas transgénicas T3 homocigotas para el transgen SISOS3, mostrando una única señal de hibridación con la sonda que reconoce un fragmento del gen de resistencia a higromicina.

### R3.2. Determinación de los niveles de expresión de SISOS3.

El análisis por PCR a tiempo real reveló que, respecto a las plantas no transformadas, las líneas transgénicas T3 1-3-1 y 2-1-1 mostraban una mayor expresión de SISOS3 en las raíces de las plantas cultivadas en ausencia de estrés salino. Sin embargo, en estas condiciones no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de SISOS3 en raíces de plantas sin transformar (Figura R27). En presencia del estrés salino, todas las plantas, presentaron una clara disminución de la expresión de SISOS3 (Figura R27). A pesar de esa disminución las líneas transgénicas 1-3-1 y 2-1-1 siempre mostraron mayores niveles de expresión de SISOS3 que las plantas sin transformar.

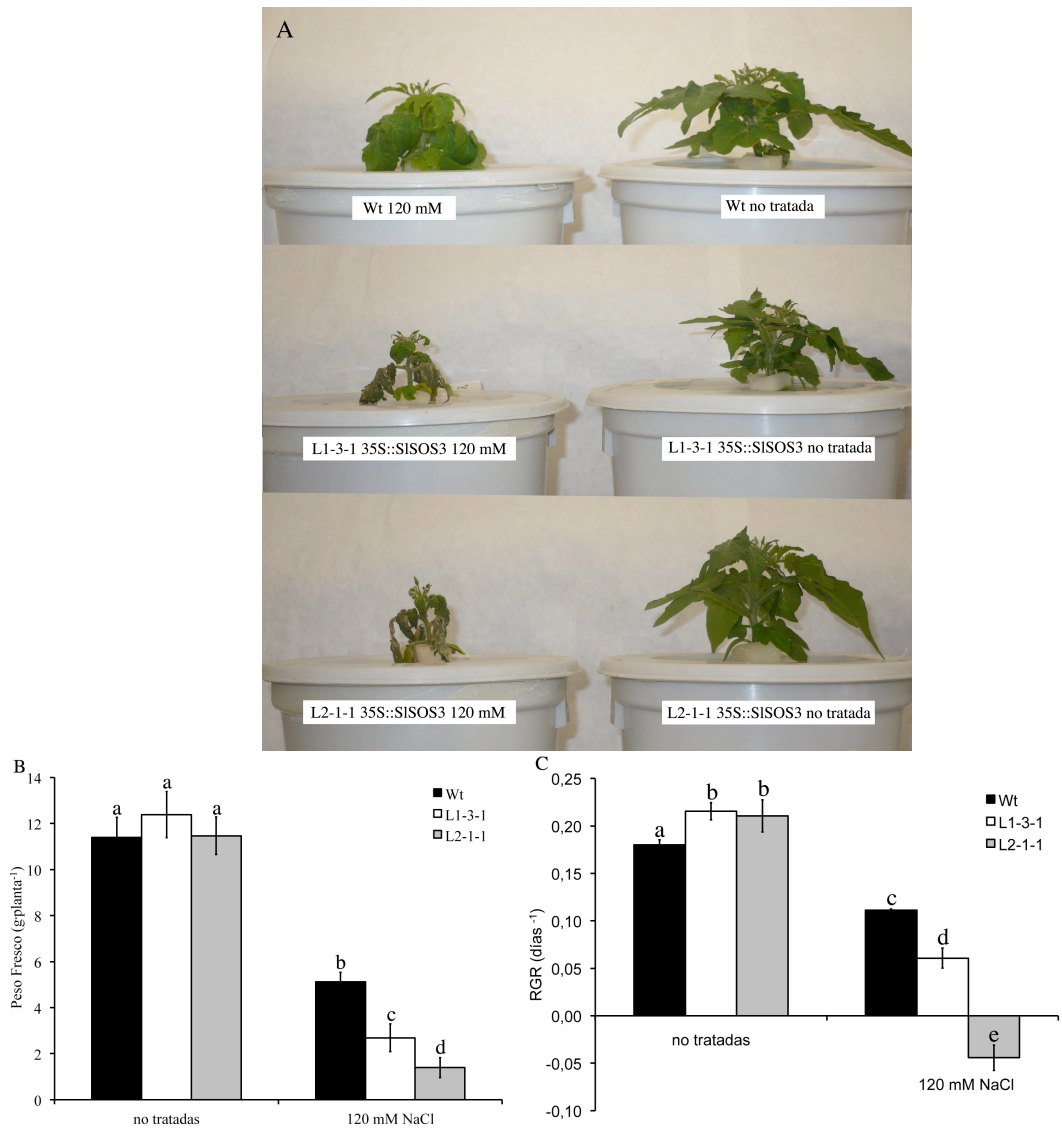


**Figura R27.** Niveles de expresión relativa de SISOS3, cuantificado por PCR a tiempo real, en las raíces de plantas sin transformar (Wt) y en las líneas transgénicas T3 homocigotas 1-3-1 y 2-1-1. Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a la expresión de SISOS3 en plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

### R3.3. Caracterización fisiológica de las plantas sobreexpresoras SISOS3.

Las plantas transgénicas homocigotas T3 cultivadas en hidropónico en ausencia de NaCl crecieron de forma similar que las plantas no transformadas (Figura R28A). En presencia de 120 mM NaCl, todas las plantas presentaban una clara disminución en su crecimiento, principalmente de la parte aérea, con un gran número de hojas afectadas de clorosis (Figura R28A). Este efecto fue claramente superior en las plantas transgénicas de las líneas 1-3-1 y 1-2-1, que mostraron efectos muy severos, con una disminución drástica del crecimiento, donde las hojas, especialmente las más viejas, presentaban una gran necrosis (Figura R28A). En ausencia de estrés salino el crecimiento de las plantas, expresado como peso fresco y RGR, fue ligeramente superior en las líneas transgénicas 1-3-1 y 2-1-1 que en las plantas no transformadas; mientras que en presencia de NaCl el crecimiento de estas líneas se veía sensiblemente disminuido, comparado con el de las plantas no transformadas (Figura R28B y C).

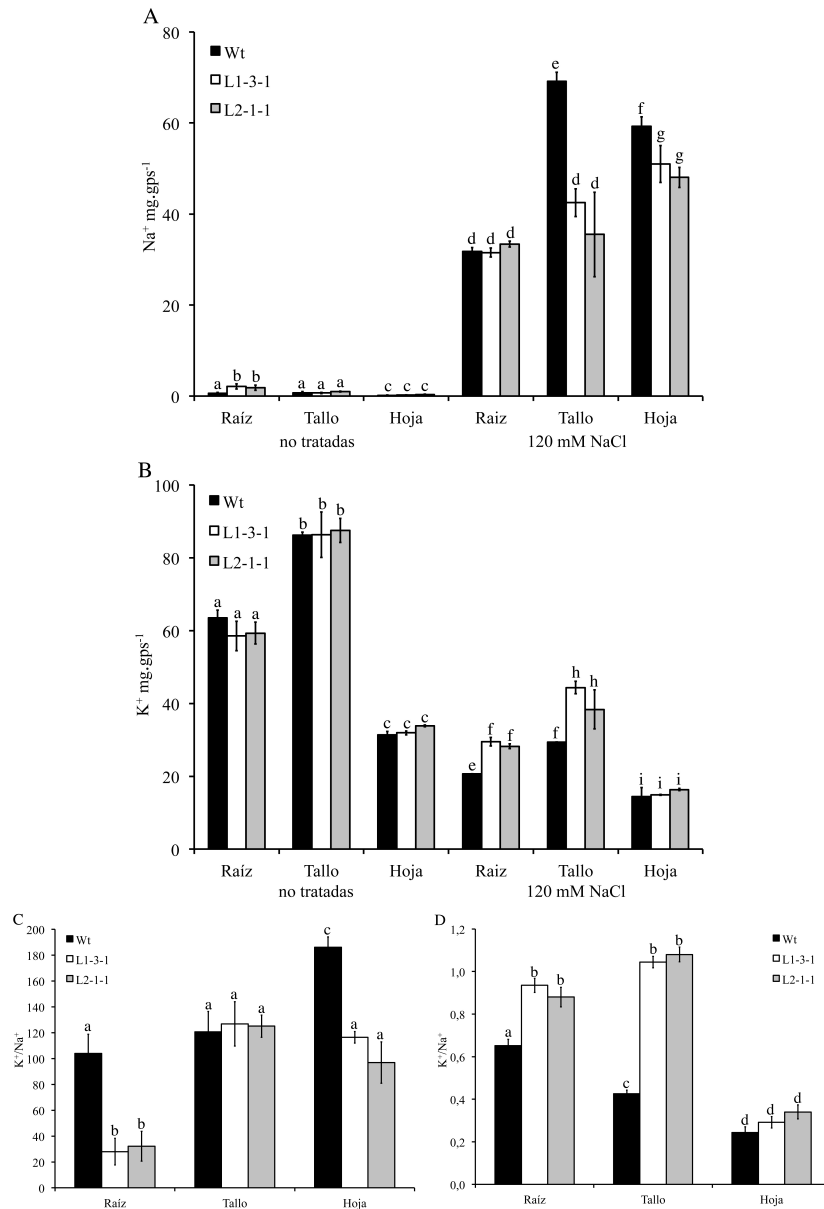




**Figura R28.** Efecto del estrés salino sobre el crecimiento de plantas T3 sobreexpresoras de SISOS3 y no transformadas (Wt). Plantas de 25 días se cultivaron en presencia de 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante los últimos 10 días del cultivo hidropónico. A) Imagen representativa de un ensayo a tiempo final; B) Peso fresco (gramos por planta) a tiempo final; C) RGR (días<sup>-1</sup>), en función del peso seco a los 5 y 10 días del inicio del tratamiento. En todos los casos los valores son medias  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes, con 3 réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

El análisis del contenido iónico ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) se llevó a cabo en el material seco de tejidos de raíz, tallos y hojas procedente del muestreo realizado 5 días después del

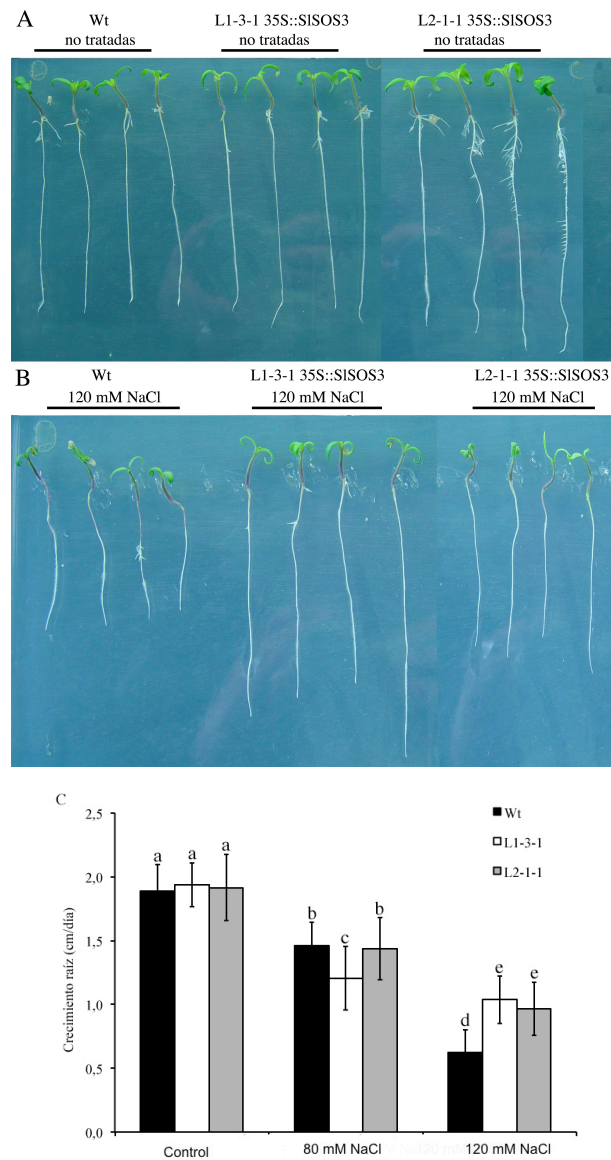
inicio del tratamiento salino. En presencia de 120 mM NaCl, el contenido en Na<sup>+</sup> en tallos y hojas de las líneas transgénicas 1-3-1 y 2-1-1 disminuyó significativamente con respecto a las plantas no transformadas pero no cambió en las raíces de ambos tipos de plantas (Figura R29A). El contenido de K<sup>+</sup> fué similar en los diferentes tipos de plantas en condiciones control, mientras que en presencia de NaCl, las líneas transgénicas 1-3-1 y 2-1-1, acumularon significativamente más K<sup>+</sup> en raíces y tallos que las plantas sin transformar (Figura R29B). Como resultado del estrés salino, las líneas 1-3-1 y 2-1-1 mostraron una mayor razón K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en la raíz y, sobretodo, en el tallo, no encontrándose diferencias significativas en las hojas de estas líneas con respecto a la de las plantas sin transformar (Figura R29D).



**Figura R29.** Contenido de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en raíces, tallo y hojas de plantas de tomate sobreexpresoras de SISOS3 y sin transformar (Wt). Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante los últimos 10 días del cultivo hidropónico. Se muestran los contenidos iónicos a los 5 días de tratamiento. A) Contenido de Na<sup>+</sup>; B) Contenido de K<sup>+</sup>; C) Relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en plantas no tratadas; D) Relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en plantas tratadas. Los resultados son media ± desviación estándar de 2 experimentos independientes, con cuatro réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan P < 0,05).

El fenotipo de las plantas sobreexpresoras de SISOS3 se analizó también en estadios jóvenes de desarrollo. Para realizar estos ensayos, semillas germinadas en placa con 1,5 cm de radícula fueron transferidas a medio MG suplementado con 0 (Control) y 120 mM NaCl durante 5 días, determinándose la longitud de sus raíces primarias. Debido a que las raíces presentaban crecimiento lineal, se pudo calcular la velocidad de crecimiento relativo de la raíz principal a lo largo del tiempo (Figura R30C).

Los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento relativo de la raíz de las plántulas transgénicas, en condiciones control, no difería significativamente del de las plantas no transformadas (Figura R30A). En presencia de 120 mM NaCl, las tres líneas transgénicas mostraban claramente una mayor velocidad de crecimiento relativo de la raíz que las plántulas sin transformar (Figura R30B).



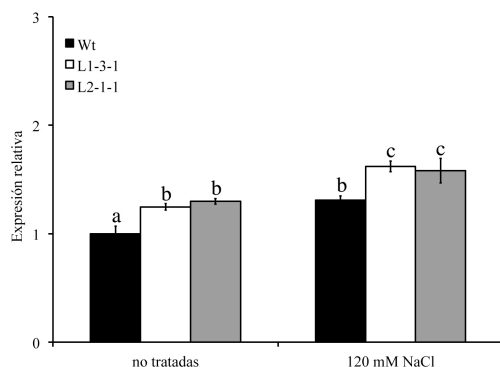
**Figura R30.** Análisis del crecimiento en placa de las líneas 35S::SISOS3 y no transformadas (Wt). A) Imagen de plántulas crecidas durante 5 días en presencia de 0 (Control) y 120 mM NaCl. B) Velocidad de crecimiento de la raíz principal a lo largo del tiempo de las plántulas cultivadas en A). Los valores son medias de 20-50 medidas por línea y tratamiento. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $P < 0,01$ ).

De igual forma que con las líneas SOS2 sobreexpresoras, las plántulas cultivadas en placa Petri durante 5 días en presencia de 0 (no tratadas) o 120 mM NaCl se transfirieron a cultivo hidropónico suplementando la solución nutritiva con

la misma concentración de NaCl del medio de cultivo en placa. Sin embargo, sorprendentemente, todas las líneas transgénicas sobreexpresoras de SOS3 murieron tras 2-3 semanas de cultivo en hidropónico en presencia de 120 mM de NaCl, mientras que las plantas no transformadas, aunque muy afectadas, pudieron alcanzar el estadio de floración (resultados no mostrados).

### R3.4. Regulación de la expresión de genes de la ruta SOS en plantas sobreexpresoras de SISOS3.

En ausencia del estrés salino, el nivel de expresión de SISOS1 en las raíces de líneas sobreexpresoras de SISOS3 (L1-3-1 y L2-1-1) fue mayor al de línea no transformada. En condiciones de estrés salino, tanto las plantas transformadas como las no transformadas mostraron un aumento pequeño, pero significativo en la expresión de SISOS1, siendo este incremento mayor en las líneas sobreexpresoras de SISOS3 que en las plantas no transformadas (Figura R31).

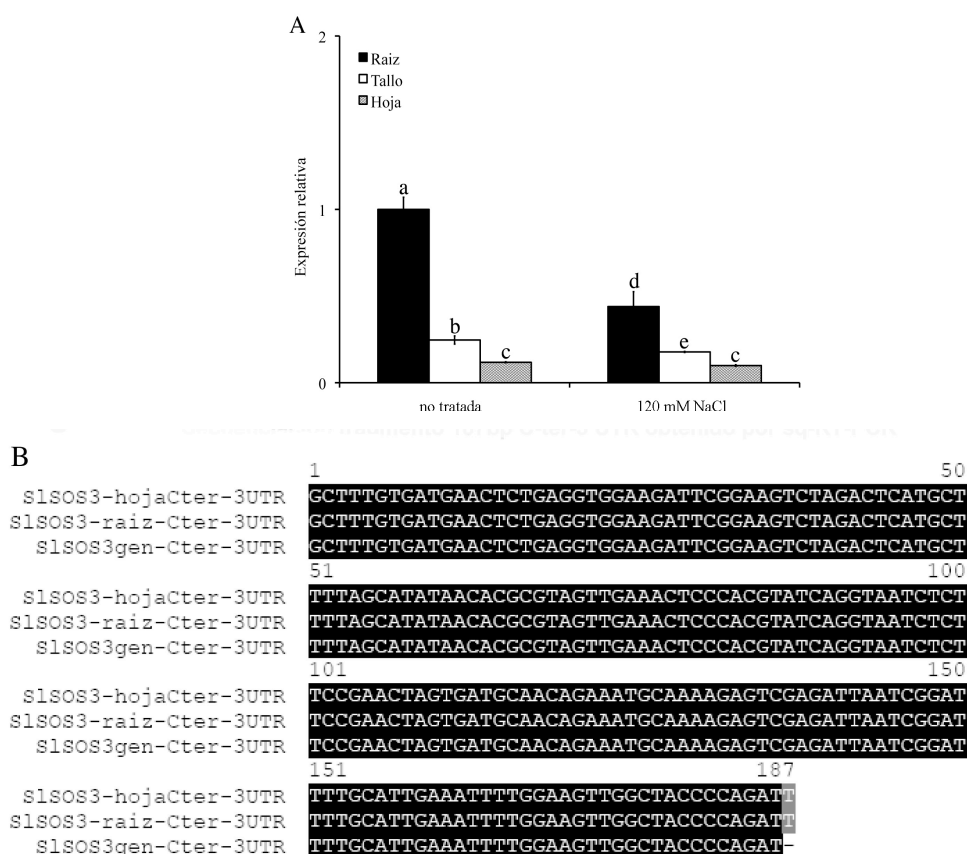


**Figura R31.** Niveles de expresión relativa de SISOS1, cuantificado por PCR a tiempo real, en las raíces de plantas sin transformar (Wt) y en las líneas transgénicas T3 homocigotas 1-3-1, y 2-1-1. Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a SISOS1 en plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

Debido al inesperado efecto negativo mostrado por el tratamiento con NaCl sobre el crecimiento de la parte aérea de algunas líneas sobreexpresoras de SISOS3,

se analizaron también los niveles de expresión de este gen en las plantas sin transformar.

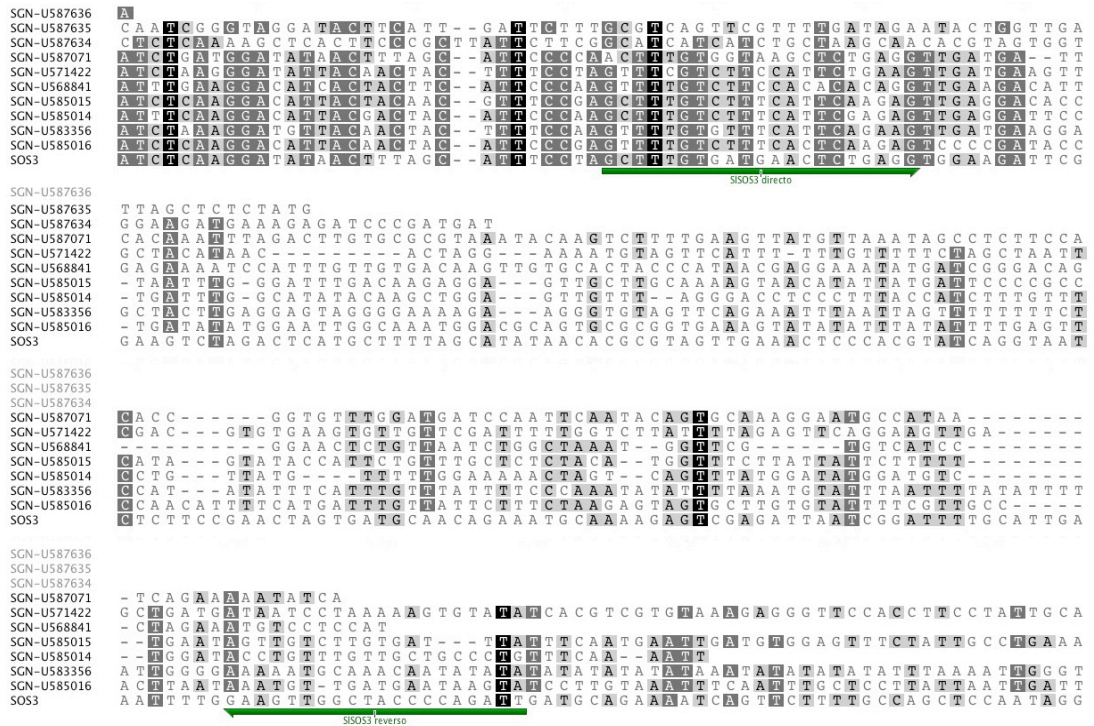
El análisis por PCR a tiempo real reveló que SISOS3 se expresaba preferencialmente en raíces, pero también en el tallo y en las hojas de tomate sin transformar, aunque a niveles bastante menores que en las raíces, y disminuyendo en todos los tejidos por efecto del tratamiento salino (Figura R32A),



**Figura R32.** A. Niveles de expresión relativa de SISOS3, cuantificado por PCR a tiempo real, en las raíces, tallos y hojas de plantas sin transformar (Wt). Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a la expresión de SISOS3 en raíces de plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan  $P < 0,05$ ). B. Secuencia nucleotídica obtenida por secuenciación de cada uno de los fragmentos C-ter-3'UTR de 187bp de raíces y hojas, aislado por qRT-PCR a partir de RNA total de cada tejido. Como secuencia control, se muestra la secuencia del fragmento de PCR obtenido a partir de DNA genómico como molde.

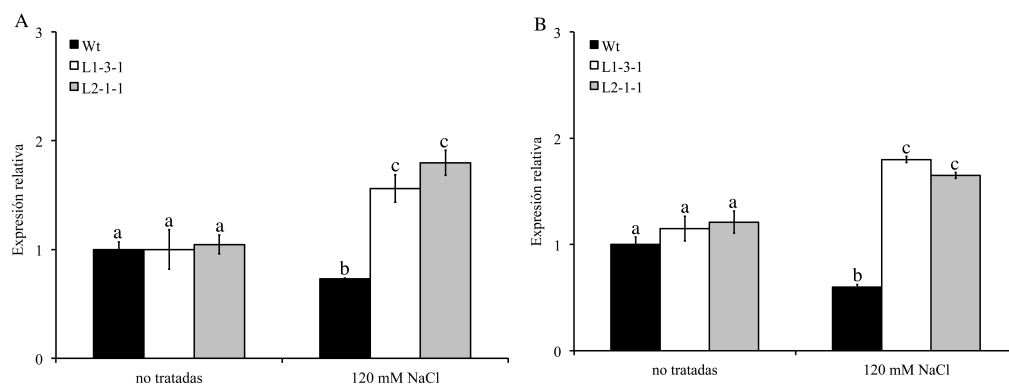
SOS3 (CBL4) pertenece a la familia de proteínas CBLs, formada por 10 miembros en *Arabidopsis* (Gong et al., 2004; Kolukisaoglu et al., 2004). Puesto que en tomate no era descartable que hubiera un número similar de miembros, de esta forma cabría la posibilidad de que alguno de ellos, distinto de SISOS3, hubiera podido ser amplificado por RT-PCR a tiempo real en tejidos diferentes a la raíz. Para descartar esta posibilidad, se llevó a cabo una búsqueda informática de secuencias con homología a CBL4 (SOS3) de tomate, disponibles en las bases de datos del proyecto SOL (International Solanaceae Genomics Project, <http://solgenomics.net/>). Dicha búsqueda predice al menos la expresión de hasta 9 unigenes, además de SISOS3 (Fig R33). El alineamiento de las diferentes secuencias reveló que los cebadores empleados para SISOS3 y que abarcaba una pequeña parte del extremo C-terminal y parte del extremo 3' no traducido (Cter-3'UTR), zona usualmente muy poco conservada en cualquier familia génica, efectivamente presentaba zonas claramente no conservadas, especialmente para el cebador reverso, por lo que parece poco probable que ambos cebadores amplificaran alguna CBL diferente de SISOS3 (Figura R33). Es más, la secuenciación de los fragmentos de 187bp a partir de RNA total de hoja y raíz tratado con DNAsa libre de RNAsas con los mismos cebadores usados para PCR a tiempo real, confirmaba que los mensajeros amplificados correspondían a SISOS3 (Fig. 32B). Todos estos resultados confirmaban que SISOS3 se expresa en tejidos de tallos y hojas, aunque en menor medida que en la raíz.





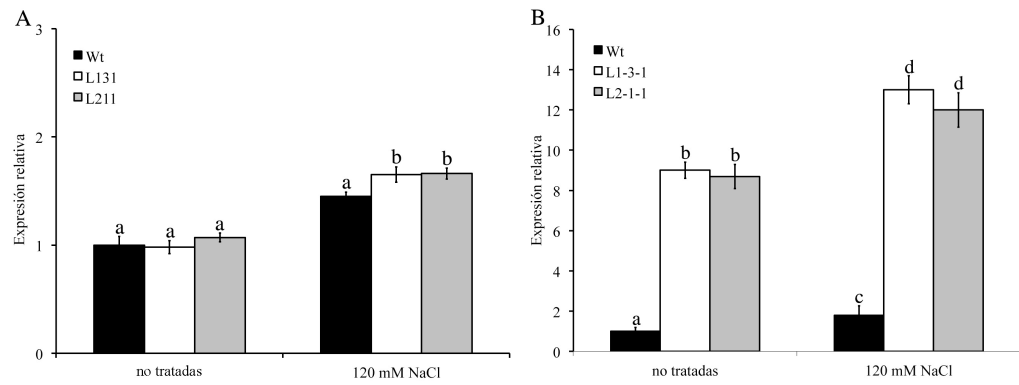
**Figura R33.** Alineamiento de la zona 3' no traducida de diferentes unigenes correspondiente a la familia de CBLs de tomate (secuencias consenso obtenidas a partir de secuencias expresadas EST). Los cebadores empleados para amplificar SISOS3 por qRT-PCR aparecen subrayados con una flecha.

El análisis de los niveles de expresión de SISOS3 en el tallo (Figura R34A) y en hojas de las plantas transformadas y no transformadas mostró que, en ausencia de estrés salino, no existían diferencias significativas entre ellas (Figura R34A y B). Sin embargo, cuando las plantas se cultivaban en condiciones de estrés salino, las líneas transgénicas 1-3-1 y 2-1-1 mostraban un aumento significativo en los niveles de transcrito de SISOS3 tanto en el tallo como en las hojas, en comparación con los niveles detectados en las plantas no transformadas (Figura R34A y B).



**Figura R34.** Niveles de expresión relativa de SISOS3, cuantificado por PCR a tiempo real, en el tallo (A) y hojas (B) de las plantas sin transformar (Wt) y de las líneas transgénicas T3 1-3-1 y 2-1-1. Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a la expresión de SISOS3 en plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

Como ya se ha indicado, SOS3 es una proteína sensora de  $Ca^{2+}$  que forma parte de una ruta de señalización constituida además por la proteína quinasa SOS2 y el antiportador  $Na^+/H^+$  de membrana plasmática, SOS1. En este trabajo hemos llevado a cabo un estudio de los niveles de expresión de SISOS1 en plantas de tomate que sobreexpresan SISOS3, a fin de determinar si SISOS1 está regulado por SISOS3 en las plantas transgénicas. En ausencia del estrés salino se observó que la expresión de SISOS1 era similar en los tallos de las diferentes líneas transgénicas y las plantas sin transformar (Figura R35A); mientras que en condiciones de estrés salino aumentaban significativamente los niveles de expresión de este gen en las líneas 1-3-1 y 2-1-1 (Figura R35A). En el caso de las hojas, las líneas 1-3-1 y 2-1-1 mostraban niveles mucho mayores de SISOS1 que las plantas sin transformar tanto en presencia como en ausencia de estrés salino (Figura R35B).

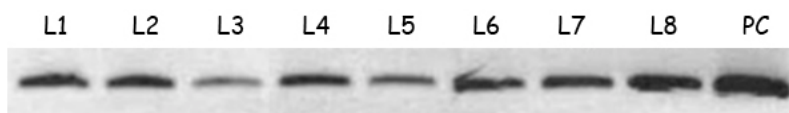


**Figura R35.** Niveles de expresión relativa de SISOS1, cuantificado por PCR a tiempo real, en el tallo (A) y hojas (B) de las plantas sin transformar (Wt) y de las líneas transgénicas T3 1-3-1 y 2-1-1. Plantas de 25 días se trataron con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días. Los resultados se expresan como incremento o disminución respecto a la expresión de SISOS1 en plantas Wt en ausencia de estrés, a la que se le asigna valor 1. Diferentes letras indican valores significativamente diferentes (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).

## R4. Sobreexpresión de SINhaD en tomate.

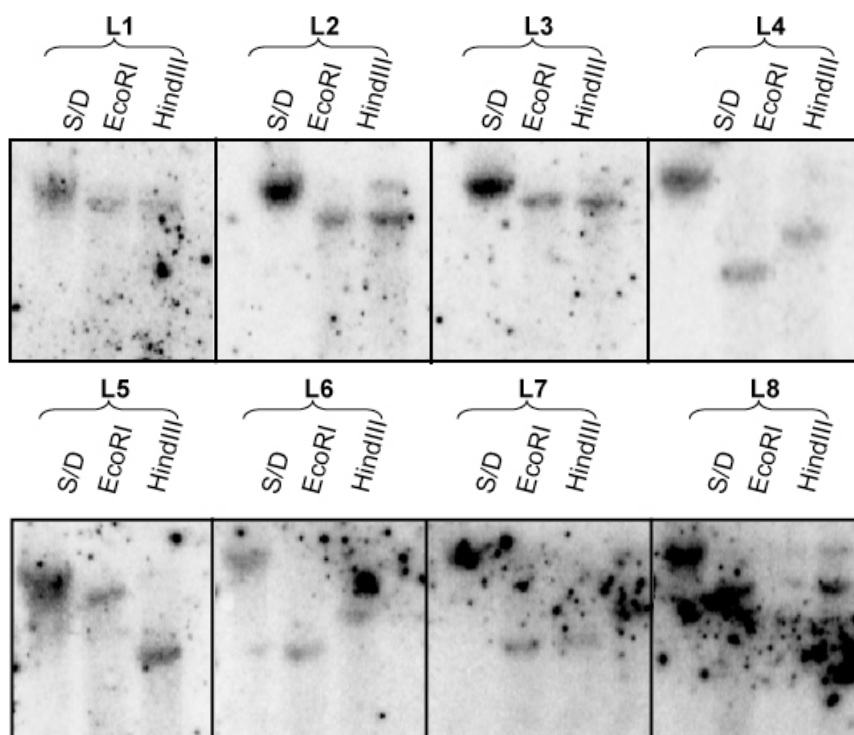
### R4.1. Obtención de plantas homocigotas y mono-locus para el transgen.

Se llevaron a cabo 2 experimentos independientes de transformación de cotiledones de tomate. En total se usaron para la transformación unos 500 segmentos de cotiledones, a partir de los cuales se regeneraron 19 plantas con capacidad de crecer en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  higromicina. A partir de DNA genómico de todas las líneas T1 se detectó por PCR el fragmento de 468 pb del gen de resistencia a higromicina en las 19 plantas regeneradas. De entre estas líneas se escogieron 8 para estudios posteriores (Figura R36).



**Figura R36.** Detección por PCR de un fragmento del gen de resistencia a higromicina en plantas transformadas T1. Como control positivo se utilizó la construcción de sobreexpresión pCAMBIA1303-SINhaD (PC).

Los ensayos de *Southern blot* mostraron que la mayoría de las líneas transgénicas T1 presentaba un único lugar de hibridación con la sonda marcada siendo dicha señal diferente cuando el DNA genómico había sido digerido con diferentes enzimas de restricción (Figura R37), lo que indicaba que estas líneas eran portadoras de una única inserción del transgen SINhaD en su genoma. Las plantas no transformadas no mostraron ninguna señal de hibridación (resultados no mostrados).



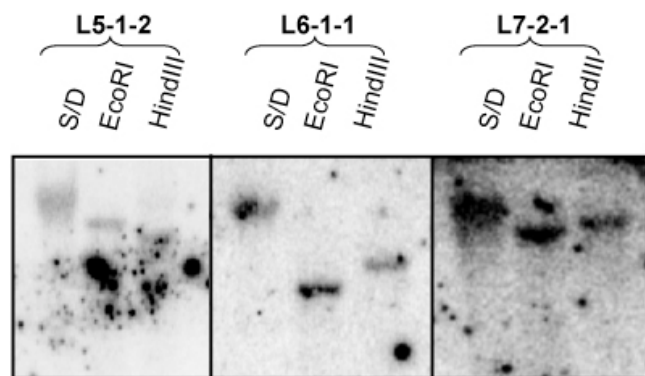
**Figura R37.** Southern blot de diferentes líneas transgénicas de tomate transformadas con la construcción pCAMBIA1303-SINhaD.

A partir de las líneas T1 con una sola inserción se realizaron sucesivas autofecundaciones hasta obtener líneas homocigotas T3 (Tabla R4).

**Tabla R4.** Porcentajes de germinación, en presencia de higromicina, de semillas de las líneas transformantes T1 con una única inserción del transgén SINhaD y de semillas de las líneas T2 y T3 obtenidas por su autofecundación. Para cada determinación se emplearon 50 semillas. Los valores están referidos a los porcentajes de germinación obtenidos en ausencia de higromicina, que se consideró 100 %.

T1	Germinación (%)	T2	Germinación (%)	T3	Germinación (%)
5	83,3	5-1	93,0	5-1-2	100
6	77,8	6-1	93,8	6-1-1	100
7	83,3	7-2	89,9	7-2-1	100

Las semillas de las líneas L5-1-2, L6-1-1, L7-2-1, presentaban un 100 % de germinación en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  higromicina, por lo que las plantas obtenidas de estas semillas se consideraron líneas homocigotas T3, que además mantenían una única inserción del transgen SINhaD (Figura 38).



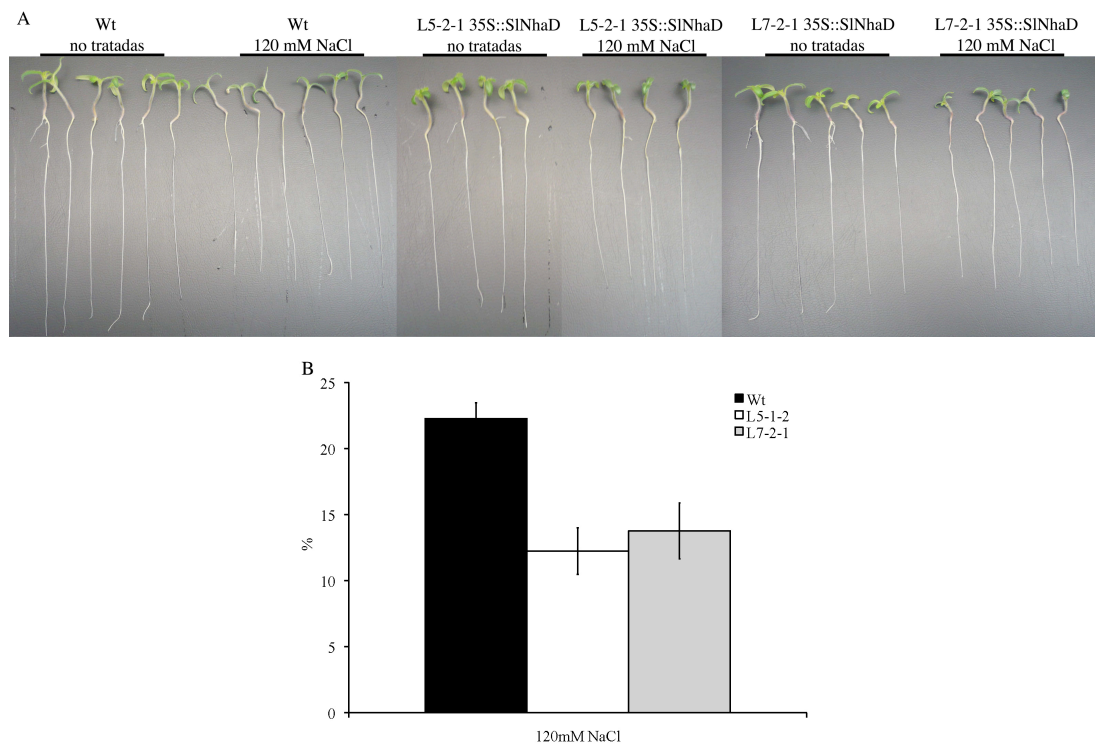
**Figura R38.** *Southern blot* de las 3 líneas transgénicas T3 homocigotas para el transgen SINhaD.

#### **R4.2. Caracterización fisiológica de las plantas sobreexpresoras SINhaD.**

Se evaluó el fenotipo de las plantas sobreexpresoras de SINhaD en estadios jóvenes de desarrollo, cuando las plántulas carecen de un sistema radicular y un tallo desarrollado, así como de hojas verdaderas y expandidas, donde procesos como el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia o la acumulación vacuolar de  $\text{Na}^+$  deben de producirse de forma muy incipiente.

Para ello, se germinaron semillas en medio MG en placas Petri y cuando las plántulas mostraron una radícula de 1,5 cm fueron transferidas a placas conteniendo medio MG suplementado con 0 (no tratadas) y 120 mM NaCl durante 5 días, determinándose la longitud de sus raíces primarias. En ausencia de tratamiento salino se observó que la raíz primaria de las plántulas no transformadas era más larga que la de las transgénicas; mientras que en presencia de 120 mM de NaCl se producía en todos los casos una disminución de la longitud de la raíz respecto a la de las plántulas

cultivadas en ausencia de NaCl (Figura R39A). No obstante, el efecto inhibitorio provocado por el NaCl sobre el crecimiento de la raíz fue menor en las líneas transgénicas que en la no transformada (Figura R39B).



**Figura R39.** Crecimiento de líneas transgénicas T3 sobreexpresoras de SINhaD (L5-1-2 y 7-2-1) y no transformadas (Wt). A) Imagen de plántulas crecidas durante 5 días en presencia de 0 (no tratada) y 120 mM NaCl. B) Longitud de la raíz principal de estas plantas. Los resultados se expresan como porcentaje de disminución respecto a la longitud de la raíz de plantas no tratadas con NaCl. Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes, con 4 réplicas cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $P < 0,05$ ).





## **V. DISCUSIÓN**



El incremento en la salinidad de los suelos, debido en parte al abuso de fertilizantes y la irrigación con aguas de baja calidad de alto contenido en sales, tiene un efecto negativo para la producción agrícola, además de plantear una seria amenaza medioambiental. La identificación y el estudio de los mecanismos de regulación de transportadores iónicos relacionados con la tolerancia a la salinidad y la distribución de potasio en las células vegetales constituye un paso previo a la aplicación de estrategias biotecnológicas que podrían permitir solventar estos problemas en cultivos de interés agronómico, como el tomate. Como resultado de los estudios desarrollados en el grupo de investigación en que se ha realizado esta Tesis Doctoral se han identificado varios transportadores NHX de tomate que son importantes para la homeostasis del potasio, la tolerancia a la salinidad y, posiblemente, el desarrollo de la planta y la producción de frutos. Asimismo, se han identificado en tomate los componentes de la ruta SOS, poniéndose de manifiesto mediante estudios de complementación heteróloga, la participación de estas proteínas en la respuesta al estrés salino. Partiendo de estos antecedentes previos, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el potencial biotecnológico de algunas de estas proteínas, en concreto LeNHX2, SISOS2, SISOS3 y SINhaD, en relación a la tolerancia a la salinidad en plantas de tomate. Para ello, se ha seguido una estrategia de sobreexpresión génica en tomate y se ha llevado a cabo la caracterización fenotípica de las plantas transgénicas y el estudio de alguno de los mecanismos bioquímicos responsables de los fenotipos observados.

### **D1. Plantas sobreexpresoras de LeNHX2.**

Como se ha mencionado en los antecedentes científicos de este trabajo, las proteínas NHX están ampliamente implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$ . Es por ello que la obtención de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan algunas de estas proteínas con actividad antiportadora catión/protón,

pueden ser una buena alternativa para la obtención de plantas más tolerantes a la salinidad. En este sentido, estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han permitido identificar y caracterizar funcionalmente la proteína LeNHX2 de tomate, como el primer antiportador  $K^+/H^+$  de localización prevacuolar/endosomal, descrito en plantas (Venema et al., 2003), perteneciente a la clase II del grupo IC (*IntraCellular*) de la subfamilia de NHE/NHX (Brett et al., 2005a, Pardo et al., 2006, Rodríguez-Rosales et al., 2009). Estudios posteriores han demostrado que la sobreexpresión de LeNHX2 en *Arabidopsis* favorece la acumulación de  $K^+$ , pero no de  $Na^+$ , y provoca una inhibición del crecimiento en ausencia de  $K^+$ , indicando que dicho transportador podría estar implicado en la regulación del pH, osmolaridad y volumen de orgánulos endosomales, procesos en los que el  $K^+$  es un catión clave (Rodríguez-Rosales et al., 2008). Además, dicha sobreexpresión incrementó la tolerancia de *Arabidopsis* a la salinidad, mientras que el silenciamiento de LeNHX2 en tomate incrementó su sensibilidad al NaCl. Todos estos datos indicaban que la regulación de la homeostasis de  $K^+$  por LeNHX2 era esencial para el crecimiento y desarrollo normal de la planta y jugaba un importante papel en la respuesta al estrés salino a través de una mejora en la acumulación de  $K^+$  (Rodríguez-Rosales et al., 2008).

En este trabajo se han obtenido plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan LeNHX2 bajo control del promotor constitutivo 35S. El análisis del fenotipo de estas plantas en función de los tratamientos aplicados se llevó a cabo comparando líneas no transformadas con dos líneas T3 homocigotas y mono-locus para el transgen (L4-5-2 y L9-3-2). La selección de las líneas T3 se realizó de acuerdo con un análisis de tipo *Southern* y estudios de segregación mendeliana del gen de resistencia a higromicina, introducido en la construcción de sobreexpresión para facilitar la selección de los transformantes (Figuras R2 y 3, Tabla R1). Las raíces de ambas líneas transgénicas presentaron mayores niveles de expresión de LeNHX2 que las de plantas sin transformar en ausencia de estrés salino, mientras

que dicha expresión se incrementó fuertemente por efecto del tratamiento de 5 días con 120 mM de NaCl tanto en las plantas transgénicas como en las no transformadas (Figura R4). El aumento de transcritos de LeNHX2 en las plantas de tomate sometidas a estrés salino ya había sido descrito con anterioridad en nuestro laboratorio, demostrándose que LeNHX2 se expresaba de forma constitutiva en toda la planta, tanto en la especie de tomate silvestre halotolerante, *S. pimpinellifolium*, como en el cultivar de tomate sensible a la salinidad, *S. lycopersicum* cv. Volgogradsky, si bien, se encontraron los mayores niveles de expresión en la especie silvestre, y especialmente en la raíz, (Gálvez, 2009). Por tanto, una mayor expresión de LeNHX2 tanto de forma constitutiva, como en respuesta al estrés salino parecía correlacionarse con una mayor tolerancia de la planta a la salinidad (Gálvez, 2009). Análogamente, Zahran et al., (2007) habían encontrado una correlación positiva entre la capacidad de las plantas de *Medicago intertexta* para acumular Na<sup>+</sup> en respuesta a la aplicación de tratamientos salinos y el aumento en los niveles de expresión de los genes NHX, poniendo de manifiesto la implicación de dichos genes en la respuesta de esta leguminosa a la salinidad.

El incremento del nivel de expresión de un gen como LeNHX2 bajo el control del promotor constitutivo 35S en las plantas transgénicas por efecto del estrés salino constituye un fenómeno frecuente y podría ser debido a mecanismos de regulación postraduccionales basados en el incremento de la estabilidad o a una menor tasa de degradación del ARNm en presencia del estrés salino, tal y como se ha descrito para el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de membrana plasmática, AtSOS1 (Chung et al., 2008).

La presencia de un epítipo de histidinas en el extremo C-terminal del transgen en la construcción para la sobreexpresión de LeNHX2, el cual parecía no afectar a su actividad (Venema et al 2003, Rodríguez-Rosales et al 2008), nos permitió analizar la presencia de la proteína LeNHX2 en las plantas transgénicas mediante inmunodetección con anticuerpos contra dicho epítipo. El análisis de

*Western blot*, reveló la presencia del transportador LeNHX2 exclusivamente en las membranas microsomales obtenidas de raíces de plantas sobreexpresoras, ya que la proteína LeNHX2 endógena es indetectable por el anticuerpo usado. Estos resultados confirmaron que una mayor expresión del gen se traduce en un incremento del número de moléculas de proteína LeNHX2. Dicha proteína mostró un tamaño molecular superior al detectado para LeNHX2 purificado a partir de fracciones membranales de levaduras que expresan este gen (Figura R5), probablemente debido a algún tipo de modificación postraducciona sufrida durante su expresión en la planta. En consonancia con los datos anteriores, y con estudios previos llevados a cabo en *Arabidopsis* (Rodríguez-Rosales et al., 2008), las plantas de tomate transgénicas mostraron, en relación a las controles, una mayor actividad antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{K}^+/\text{H}^+$  en vesículas endomembranales de raíces tanto en ausencia como en presencia del estrés salino, indicando con ello que la sobreexpresión de LeNHX2 era funcional y proporcionaba a la planta una mayor actividad antiporte catión/ $\text{H}^+$  y, por tanto, una mayor capacidad para la compartimentación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en endosomas (Figura R10).

La sobreexpresión del antiportador LeNHX2 en plantas de tomate cultivadas en sistema hidropónico en condiciones normales no tuvo consecuencias aparentes en su crecimiento con respecto a las no transformadas (Figuras R6 y R7). Sin embargo, en ausencia de  $\text{K}^+$  se observó una clara disminución del crecimiento de la parte aérea, medida como peso fresco de tejido (Figura R7). Este efecto ya había sido descrito en un trabajo previo de nuestro grupo con plantas de *Arabidopsis* sobreexpresoras de LeNHX2 cuando eran cultivadas en ausencia de  $\text{K}^+$  (Rodríguez-Rosales et al., 2008). Recientemente, Leidi et al., (2010) han descrito este mismo efecto en plantas de tomate que sobreexpresan AtNHX1, un antiportador  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+/\text{H}^+$  de tipo I, de localización vacuolar, cuando son cultivadas en ausencia de  $\text{K}^+$ . En ambos casos, parece posible que una alteración en la concentración de  $\text{K}^+$  citoplásmico o de pH en las plantas transgénicas, por una mayor actividad de transporte de  $\text{K}^+$  debida a

LeNHX2 o AtNHX1 hacia compartimentos intracelulares module la selectividad y actividad de mecanismos de absorción de  $K^+$  de alta afinidad, los cuales son más específicos para el  $K^+$  (Ashley et al 2006., Rodriguez-Navarro y Rubio, 2006). Así, se había observado que la sobreexpresión de AtNHX1 en tomate promovía la acumulación vacuolar de  $K^+$  a expensas del  $K^+$  citoplásmico en condiciones de déficit del catión en el medio externo, generándose en esta situación una señal para la inducción transcripcional del transportador de  $K^+$  de alta afinidad, LeHAK5, y por consiguiente, una mayor absorción de  $K^+$  por la raíz (Leidi et al., 2010). Por tanto, una mayor expresión de LeHAK5, principal responsable de la absorción de  $K^+$  en tomate a muy bajas concentraciones en el medio de cultivo (Nieves-Cordones et al., 2007 y 2008), podría ser también indicativo de una disminución en las concentraciones de  $K^+$  citoplásmico, ocasionado por una mayor actividad de intercambio  $K^+/H^+$  en el sistema endosomal de las raíces de las líneas sobreexpresoras de LeNHX2. Efectivamente, en ausencia de  $K^+$  en el medio externo las plantas transgénicas presentaron mayores niveles de expresión del transportador de  $K^+$  de alta afinidad, LeHAK5 (Figura R11). La mayor expresión de LeHAK5 en las líneas sobreexpresoras de LeNHX2 explicaría 1) que en un medio normal de  $K^+$ , una mayor absorción desde el medio extracelular sea suficiente para el crecimiento normal de las plantas, contribuyendo a la mejora de la razón  $K^+/Na^+$  en la parte aérea (Figura R8C), y 2) que en ausencia de  $K^+$  en el medio de cultivo, la mayor absorción del catión sea insuficiente para contrarrestar el déficit de  $K^+$  citoplásmico causado por su compartimentación. De este modo, el  $K^+$  quedaría fisiológicamente inaccesible, produciendo en última instancia una inhibición del crecimiento de las líneas transgénicas (Figura R7).

Las plantas transgénicas crecieron significativamente mejor en presencia del estrés salino (Figura R6). Ello no pareció deberse a una mayor acumulación de  $Na^+$  en raíz y parte aérea, ya que los contenidos de  $Na^+$  en dichos tejidos no fueron diferentes a los mostrados por las plantas no transformadas (Figura R8), a pesar de

que en las primeras se había descrito un aumento de la actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas endosomales de raíces de plantas tratadas con NaCl (Figura R10). Se han obtenido resultados similares en plantas de tomate que sobreexpresan AtNHX1 (Leidi et al., 2010) y en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan LeNHX2, si bien en este caso las plantas transgénicas acumularon menor cantidad de  $\text{Na}^+$  en sus tejidos (Rodríguez-Rosales et al., 2008). A este respecto, hay que indicar que *Arabidopsis* prácticamente no tiene tallo, o al menos, tan corto que no permite una disección precisa de los contenidos relativos de  $\text{Na}^+$  en tallo con respecto a las hojas. Por tanto, factores que controlan la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a nivel de organismo bajo condiciones salinas, como son los procesos de reabsorción de  $\text{Na}^+$  por el tallo y su redistribución en hojas viejas, pueden ser diferentes de tomate, cuyo tallo juega un importante papel en la retención de  $\text{Na}^+$  (Oliás et al., 2009a).

Parece probable que la causa mas importante del mejor crecimiento de las plantas sobreexpresoras de LeNHX2 bajo condiciones salinas pueda ser una mejora de la acumulación de  $\text{K}^+$  en sus tejidos (Figura 8), lo que permitiría mantener mejor el balance osmótico, sin necesidad de una mayor acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$ . Al mismo tiempo, las reservas de  $\text{K}^+$  podrían utilizarse para mantener una óptima razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en el citosol, regulando la concentración de  $\text{K}^+$  citosólico o el pH, mediante el suministro desde las reservas endosomales del catión, o bien, mediante el aumento de la absorción de  $\text{K}^+$  asociado a una mayor actividad o afinidad de los sistemas de absorción de  $\text{K}^+$  de alta afinidad, como LeHAK5, como se ha indicado anteriormente. En este trabajo no se ha medido la expresión de LeHAK5 en las plantas de tomate afectadas por estrés salino, por lo que no se puede descartar que los cambios en la expresión de este gen afecten a la entrada de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, la implicación de LeHAK5 en un proceso de este tipo parece poco probable ya que se ha descrito que su expresión se reprime en condiciones de estrés salino (Nieves-Cordones et al., 2008, Leidi et al., 2010). Otra posibilidad es que la sobreexpresión de LeNHX2 afecte a la actividad o abundancia de otros transportadores a través de su



interferencia con la síntesis de proteínas o su localización. En este sentido, se ha descrito en levadura, que la regulación del pH en sistema endosomal tardío o en el compartimento prevacuolar por ScNHX1 es importante para el tráfico de vesículas y la localización de proteínas (Brett et al., 2005b). Ello explicaría el porqué de los grandes cambios en el contenido iónico, a pesar de que LeNHX2 está presente en pequeñas vesículas y no en la gran vacuola central (Rodríguez-Rosales et al., 2008).

## **D2. Plantas sobrepresoras de SISOS2.**

A pesar de las numerosas evidencias existentes al respecto (Munns, 2005; Ashraf y Akram, 2009) a menudo, se ha discutido que la introducción de un simple gen que codifica para una proteína efectora implicada en la respuesta a la salinidad pueda contribuir cualitativamente al incremento de un rasgo tan complejo como la tolerancia a la sal (Flower, 2004, Cuartero et al., 2006). No obstante, se han obtenido resultados muy prometedores cuando se han utilizado estrategias de manipulación de genes implicados en las rutas de transducción de señales o en la activación transcripcional de múltiples genes (factores de transcripción), que al controlar un amplio rango de proteínas efectoras pueden dar lugar a un incremento en la tolerancia tanto de forma cuantitativa como cualitativa (Vinocur y Altman, 2005; Pardo, 2010). A este respecto, los genes de la ruta SOS constituyen una importante ruta reguladora de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  bajo condiciones salinas, inicialmente descrita en *Arabidopsis* (Zhu, 2002). Estudios posteriores han mostrado su conservación funcional en arroz (Martínez-Atienza et al., 2007), tomate (Olías et al., 2008; Olías et al., 2009a; Eljakaoui, 2009) y álamo (Tang et al., 2010). En *Arabidopsis* se ha descrito que en dicha ruta, el estrés salino induce un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Knight et al., 1997), señal que es detectada por la proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  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). Finalmente, este complejo quinasa, SOS2/SOS3 incrementa el nivel de expresión de SOS1 (Shi et al., 2000) y su actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Qiu et al., 2002). Dicha actividad es responsable de la extrusión del  $\text{Na}^+$  fuera de la raíz y del transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia vía xilema para distribuir el catión entre la raíz y parte aérea (Shi et al., 2002), confiriendo tolerancia a la salinidad (Shi et al., 2003).

Aparte de participar en esta ruta SOS, SOS2 parece jugar un papel central de conexión en otros mecanismos de homeostasis iónica, como lo demuestra su interacción con algunos transportadores implicados en la compartimentación vacuolar de  $\text{Na}^+$  en condiciones de estrés salino, tales como como la  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar (Batelli et al., 2007), los antiportadores de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , NHX1 (Qiu et al., 2004) y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , CAX1 (Cheng et al., 2004). Algunos de estos transportadores regulados por SOS2, como SOS1 y NHX1, parecen conferir tolerancia a la sal cuando se sobreexpresan en plantas transgénicas (Apse et al., 1999; Shi et al., 2003). De ahí que resulte lógico pensar que la sobreexpresión de SOS2 tenga un efecto positivo sobre la regulación de las concentraciones intracelulares de  $\text{Na}^+$  (y  $\text{K}^+$ ). Por tanto, un segundo objetivo de este trabajo ha sido evaluar el potencial biotecnológico de la sobreexpresión de SOS2 de tomate en la mejora de la tolerancia del tomate al NaCl.

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, (Kolukisaoglu et al., 2004). Aunque, la secuenciación del genoma de tomate ha llegado ya a su término muy recientemente (<http://solgenomics.net>), en este trabajo no se ha hecho ningún análisis bioinformático para determinar el número exacto de isoformas de CIPKs presentes en dicho genoma. No obstante, la existencia de un gran número de secuencias ESTs con homología a la mayoría de las secuencias respectivas de *Arabidopsis*, auguran un número similar al encontrado en ambas especies. La comprobación de que la proteína

codificada por el gen putativo de tomate, SISOS2, utilizada en este trabajo constituye el verdadero ortólogo de AtSOS2 y funciona en la misma ruta SOS de tomate, se ha llevado a cabo en estudios previos en nuestro laboratorio, en base a la similitud de la secuencia de dichas proteínas, ensayos de complementación funcional en levaduras y complementación genética de mutantes *sos2* de *Arabidopsis* (Olías et al., 2008 y 2009a; Eljakaoui, 2009). Así, la secuencia aminoacídica de SISOS2 exhibió la mayor homología con la de AtSOS2, de entre todas las CIPKs de *Arabidopsis*. La coexpresión conjunta de *SISOS2* y *SISOS3* fue capaz de incrementar la tolerancia a la sal de la cepa halosensible de levadura AXT3K que llevaba inserto en su genoma una copia de *AtSOS1* o de *SISOS1*. Tanto *SISOS2* como *SISOS3* fueron capaces de rescatar los respectivos fenotipos hipersensibles a la sal de los mutantes *sos2* y *sos3* de *Arabidopsis*, evidenciando la capacidad de las proteínas de tomate de formar complejos heterólogos proteína quinasa con las respectivas proteínas de *Arabidopsis* y de sustituir funcionalmente a éstas para activar a AtSOS1 *in planta*. Todos estos resultados fueron indicativos de que los genes que componen el sistema SISOS de tomate era los ortólogos de AtSOS y funcionaban en la misma ruta de respuesta (Olías et al., 2008 y 2009a; Eljakaoui, 2009).

En el presente trabajo, el análisis del fenotipo en función de los tratamientos estudiados se llevó a cabo comparando líneas no transformadas con dos líneas T2 homocigotas y mono-locus para el transgen (L7-4 y L8-2), según se determinó mediante análisis de tipo *Southern* y segregación mendeliana de la resistencia a higromicina (Figuras R13 y Tabla R2).

Análogamente a lo que ocurría con LeNHX2, las raíces de ambas líneas transgénicas presentaron mayores niveles de expresión de SISOS2 que las plantas sin transformar en ausencia de estrés salino, mientras que dicha expresión incrementó fuertemente y de manera proporcional tanto en las plantas transgénicas como en las no transformadas por efecto del tratamiento salino (Figura R14). Este mismo efecto estimulador del estrés salino sobre la expresión de SOS2 tanto en raíces como en

parte aérea se ha observado en *Arabidopsis* (Liu et al., 2000; Yang et al., 2009), tomate (Olías et al., 2008; Eljakaoui, 2009) y álamo (Tang et al., 2010). Además, parece existir una clara correlación entre los niveles de expresión de SISOS2 y el grado de tolerancia a la salinidad exhibido por especies y variedades de tomate que difieren en el grado de tolerancia. Así, en la especie halotolerante *S. pimpinellifolium*, SISOS2 se expresa en todos los tejidos de manera constitutiva independientemente de la existencia o no de un estrés salino, mientras que en la variedad sensible *S. lycopersicum* cv. Moneymaker los niveles de SISOS2 aumentaron solo en respuesta al estrés salino, especialmente en la raíz (Olías et al., 2008; Eljakaoui, 2009; Sun et al., 2010).

En trabajos previos, se había observado que la sobreexpresión de formas activadas de AtSOS2, independientes de la acción de SOS3 (Guo et al., 2001), pero no la forma nativa, incrementaban la tolerancia de plantas transgénicas de *Arabidopsis* a la salinidad (Guo et al., 2004). Mas recientemente, se ha descrito que la sobreexpresión de AtSOS3 o AtSOS1 en *Arabidopsis* mejoraba su tolerancia a la salinidad, y en mayor medida que la sobreexpresión de AtSOS1, AtSOS2 y AtSOS3 juntas (Yang et al., 2008). En el presente trabajo, la sobreexpresión de SISOS2, sin embargo, confiere un incremento de la tolerancia a la salinidad en plantas de tomate, *S. lycopersicum* cv MicroTom, en estadios vegetativos desarrollados en condiciones de transpiración. Ello se manifiesta por una menor clorosis foliar, una mayor velocidad de crecimiento relativo (Figura R15) y una floración más temprana que le permite en última instancia una mayor producción de frutos comparado con las plantas no transformadas (Figura R19 y R20).

Este fenotipo tolerante puede provenir de una menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en las raíces y tallos de las plantas transgénicas (Figura R16). Dicho efecto podría ser atribuido a una disminución de la absorción neta de  $\text{Na}^+$ , debida a una mayor extrusión del catión desde la raíz hacia el medio extracelular, ya que como era de esperar, la sobreexpresión de SISOS2 trajo consigo un incremento de la expresión de

SISOS1 endógeno de la raíz (Figura R21), que se correlaciona con una mayor actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de membrana plasmática aisladas de las raíces de las plantas transgénicas (Figura R23A). Además, ello era consistente con una mayor actividad de transporte de  $\text{H}^+$  dependiente de ATP debida a la  $\text{H}^+$ -ATPasa de plasmalema de las plantas transgénicas (Figura 23C), apoyando la idea de que SOS1 o la ruta de transducción de señales de SOS, de alguna forma, controla el bombeo de  $\text{H}^+$  dentro de la zona madura de la raíz (Shabala, 2005; Olías et al., 2009a; Guo et al., 2009). Aunque no se ha medido en otros tejidos, el hecho de que SISOS1 se expresara en todos los tejidos de la planta, en presencia de un estrés salino (Olías et al., 2009a; Eljakaoui, 2009), induce a pensar que la sobreexpresión constitutiva de SISOS2 tenga un efecto positivo sobre la expresión y actividad de SISOS1 en la parte aérea, si bien aquí, la activación de SOS1 por el complejo quinasa inducido por estrés salino vendría determinada por la interacción de SOS2 (CIPK24) con la proteína sensora CBL10 (SCaBP8), en vez de SOS3 (Quan et al., 2007; Kim et al., 2007). En *Arabidopsis*, *Thellungiella* y tomate, SOS1 controla tanto el eflujo de  $\text{Na}^+$  en la raíz como el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia vía xilema condicionando la distribución de iones entre la raíz y la parte aérea (Shi et al., 2002; Oh et al., 2009; Olías et al., 2009a). Además, la función de SOS1 en tomate está implicada en la capacidad del tallo de retener  $\text{Na}^+$ , previniendo así su entrada masiva a los tejidos fotosintéticos en desarrollo y podría contribuir en la exclusión de  $\text{Na}^+$  desde el citosol de las hojas jóvenes hacia el apoplasto, evitando la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$  en células con un sistema vacuolar escasamente desarrollado y favoreciendo su distribución en hojas viejas (Olías et al., 2009a y 2009b). Este aspecto, aparentemente, puede parecer menos relevante en el cultivar MicroTom, y difícil de discernir, ya que las plantas sobreexpresoras presentaron cantidades similares de  $\text{Na}^+$  en las hojas que las plantas no transformadas y en este trabajo no se hizo ninguna distinción entre los contenidos de iones de hojas jóvenes y viejas.

También la sobreexpresión de SISOS2 confiere tolerancia a la salinidad en estadios muy jóvenes de desarrollo, según se dedujo de los experimentos llevados a cabo en placa Petri, en ausencia de transpiración (Figuras R17 y R18). Aquí, a diferencia de las plantas adultas, los tejidos específicos para el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia y/o acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$  de forma no tóxica, no estarían todavía desarrollados o diferenciados, es decir, las plántulas carecen de un sistema radicular diferenciado, un tallo desarrollado y hojas verdaderas y expandidas. Por tanto, parece muy probable que el principal mecanismo de tolerancia implicado en este estadio deba provenir de la disminución de la absorción neta de  $\text{Na}^+$ , por la actividad incrementada de la extrusión del catión desde la raíz al medio externo mediada por hiperactivación de la ruta SOS en las plantas transgénicas.

Es interesante destacar que tanto las plantas transgénicas como en las no transformadas afectadas por estrés salino presentaron un menor contenido en  $\text{K}^+$  que las plantas no tratadas, si bien, dicho contenido fue todavía un poco menor en las raíces y en las hojas de las líneas transgénicas tratadas, y sin cambios en el tallo (Figura R16). Esta menor acumulación de  $\text{K}^+$  en las plantas transgénicas por efecto del estrés salino resulta controvertido a tenor del mayor nivel de expresión de LeNHX2, en las raíces (Figura R22) que, como se ha discutido en el apartado anterior, debe de estimular la acumulación de  $\text{K}^+$  en membranas intracelulares, así como la absorción desde el medio externo (apartado D1).

En cuanto al papel que juega el aumento de la expresión de LeNHX4 en las raíces de plantas sobrepresoras SISOS2 (Figura R22) hay que reseñar que LeNHX4 es un antiportador  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , de localización vacuolar que transporta ambos iones con similar afinidad y que se expresa principalmente en flores y frutos (Gálvez, 2009). Se ha demostrado que la expresión de este transportador iónico aumenta en raíces de plantas de tomate, especialmente en las de la especie silvestre tolerante al NaCl, cultivadas en condiciones salinas (Gálvez et al., en preparación). En plantas transgénicas, el efecto de la sobreexpresión de SOS2 sobre el nivel de expresión de

LeNHX4, como en el caso de LeNHX2, se ha medido en raíces, en las que se evidenció una mayor expresión de este transportador en presencia de estrés salino, hecho que parece correlacionarse con una mayor actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de tonoplasto aisladas de raíces de estas plantas (Figura 23). El mayor incremento en la expresión de LeNHX4 en las especies de tomate tolerantes a la sal respecto a las especies sensibles, unido al aumento de la expresión de este transportador en las plantas que sobreexpresan SISOS2 sugiere que la expresión de la proteína LeNHX4 tiene valor adaptativo en condiciones de estrés salino.

Existen gran número de evidencias que demuestran que la inducción de la actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolar tras la exposición a la sal se correlaciona con la tolerancia a este estrés (Staal et al., 1991; Barkla et al., 1995; Ballesteros et al., 1997, Hamada et al., 2001; Parks et al., 2002; Queirós et al., 2009). También se ha descrito un incremento de la tolerancia a la salinidad en las plantas transgénicas que sobreexpresaban antiportadores vacuolares NHX (Zhang y Blumwald, 2001, Zhang et al., 2001; Apse y Blumwald, 2007; Rodríguez-Rosales et al., 2009). Por tanto, la regulación del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolar por SOS2 podría tener valor adaptativo cuando las plantas son sometidas a estrés salino. En *Arabidopsis* ya se había demostrado que la actividad de transporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en vesículas de tonoplasto es diana de la ruta reguladora SOS, ya que las raíces de plantas mutantes *sos2* tuvieron una actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolar muy reducida dependiente de proteínas NHX (Qiu et al., 2004). En nuestro sistema, la tolerancia observada de las plantas transgénicas parece tener mas que ver con un mecanismo de exclusión del  $\text{Na}^+$  que con un mecanismo de acumulación intracelular y tolerancia tisular al  $\text{Na}^+$ . Si el incremento observado de la actividad antiportadora en vesículas de tonoplasto de raíces de plantas transgénicas tratadas con NaCl es debido al aumento de la expresión de LeNHX4, merece ulterior investigación. En *Arabidopsis* existen 6 isoformas de NHX (Pardo et al., 2006), y al menos 4 en tomate de las que todas, excepto LeNHX2

son vacuolares (Rodríguez-Rosales et al., 2009), por tanto es posible que otras isoformas de NHX pudieran estar implicadas.

Se podría especular con la posibilidad de que los altos niveles de expresión de LeNHX4 detectados en las plantas transgénicas puedan tener ver con el fenotipo de floración temprana descrito anteriormente (Figura 20). A este respecto, análisis genéticos llevados a cabo en líneas RIL de tomate han asociado la posición cromosómica de SISOS2 con un QTL relacionado con el desarrollo de la hoja y el tiempo de floración (Villalta et al., 2008). También, el análisis *in silico* del promotor de *SISOS2* predice la presencia de un gran número de 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 respuesta a estreses bióticos y abióticos (Eljakaoui, 2009), 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 el crecimiento y desarrollo de la planta, además de su participación en relación al estrés, que abarca desde la germinación hasta el último estadio del desarrollo ontogénico.

En resumen, nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de SISOS2 en tomate incrementa su tolerancia a la salinidad principalmente a través de la regulación de los transportadores de  $\text{Na}^+$  de la membrana plasmática y de los compartimentos endosomal-vacuolar (SISOS1, LeNHX4 y quizás LeNHX2) que mantienen la homeostasis celular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

Podría postularse finalmente que las plantas transgénicas que sobreexpresan SOS2 en tomate fuertemente y de manera constitutiva en todos los tejidos presentan características típicas de especies halotolerantes tanto si se desarrollan en ausencia como en presencia de estrés. Dichas especies halotolerantes suelen encontrarse en una situación de pre-estrés que las preparan para una mejor y más rápida respuesta a condiciones de estrés abiótico, mientras que las especies cultivadas, más sensibles,



deben de inducir su maquinaria de respuesta al estrés. Dicha idea proviene de la comparación a nivel transcriptómico de *Arabidopsis* y la especie halotolerante relacionada *Thellungiella* en respuesta al estrés salino (Gong et al., 2005), y sobre todo, de una comparativa reciente a nivel transcriptómico entre la variedad de tomate sensible a la salinidad *S. lycopersicum* cv. Moneymaker y la especie halotolerante *S. Pimpinellifolium* (Sun et al., 2010).

### **D3. Plantas sobrepresoras de SISOS3.**

Un razonamiento similar al expresado en el primer párrafo del apartado D2, nos ha llevado a plantear como tercer objetivo de este trabajo, la evaluación del potencial biotecnológico de la proteína SOS3 de tomate en la mejora de la tolerancia al NaCl.

SOS3 (CBL4) pertenece a una subfamilia de proteínas sensoras de  $Ca^{2+}$  (*calcineurinB-like*), formada por 10 miembros en *Arabidopsis*, arroz y álamo (Kolukisaoglu et al., 2004; Zhang et al., 2008). Una búsqueda informática preliminar de secuencias expresadas con homología a CBL4 (SOS3) de tomate disponible en las bases de datos del proyecto SOL (*International Solanaceae Genomics Project*, <http://solgenomics.net/>) predice igual número de genes que en *Arabidopsis* y arroz (Fig R33). Como se ha discutido anteriormente para SISOS2 (apartado D2), la comprobación de que la proteína codificada por el putativo gen de tomate, SISOS3, utilizada en este trabajo constituía el verdadero ortólogo de AtSOS3 y funcionaba en la ruta SOS de tomate, se llevó a cabo en estudios previos de nuestro laboratorio, en base a la similitud de la secuencia de dichas proteínas, ensayos de complementación funcional en levaduras y complementación genética de mutantes *sos3* de *Arabidopsis* (Olías et al., 2008 y 2009a; Eljakaoui, 2009).

En el presente trabajo, el análisis del fenotipo en función de los tratamientos estudiados se llevó a cabo comparando líneas no transformadas con dos líneas T3

homocigotas y mono-locus para el transgen (L1-3-1, L2-1-1), determinadas mediante análisis de tipo *Southern* y segregación mendeliana de la resistencia a higromicina (Figuras R25, R26 y Tabla R3).

Las raíces de ambas líneas transgénicas presentaron mayores niveles de expresión de SISOS3 que las plantas sin transformar tanto en ausencia como en presencia de estrés salino, pero dicha expresión disminuyó de manera proporcional tanto en las plantas transgénicas como en las no transformadas por efecto del tratamiento salino (Figura R27). En *Arabidopsis*, la expresión de *AtCBL4/AtSOS3* fue específica de raíces y no sufría apenas variación por efecto de un estrés salino (Quan et al., 2007; Yang et al., 2009). También en tomate, se había descrito que la expresión génica de SISOS3, analizada por *Northern blot*, era específica de la raíz e incluso disminuía por efecto del estrés salino (ElJakaoui, 2009). Ello puede resultar lógico, si tenemos en cuenta que la detección de la señal de  $Ca^{2+}$  citosólico por estrés salino debe ser llevada a cabo por moléculas de SOS3 preexistentes que transducen la señal de estrés a nivel de modificación de proteínas, más que a nivel transcripcional.

El hecho de que tanto SISOS1 como SISOS2 (y también AtSOS1 y AtSOS2) se expresen ubicuamente en la planta, mientras que SISOS3 (y AtSOS3) únicamente en raíces, indicaría que la ruta reguladora SOS3-SOS2-SOS1 parece funcionar predominantemente en este órgano (Quan et al., 2007; Olías et al., 2009; Eljakaoui 2009). La identificación en *Arabidopsis* del homólogo de SOS3, SCABP8/CBL10, que se expresa exclusivamente en la parte aérea, reveló que la regulación de la homeostasis iónica por la ruta SOS en tallos y hojas, se llevaría a cabo por el complejo quinasa SCABP8/CBL10-SOS2 (Kim et al., 2007; Quan et al., 2007, Lin et al., 2009). Ambas proteínas no parecen ser redundantes funcionalmente, ya que la sobreexpresión de SCABP8/CBL10 en el mutante *sos3* rescata parcialmente el fenotipo halosensible, mientras que la sobreexpresión de SOS3 no complementó el mutante *scabp8* (Quan et al 2007). No obstante, existe controversia en cuanto a la

localización subcelular del complejo SCABP8/CBL10-SOS2. Según Kim et al. (2007), la proteína AtCBL10 interaccionaría 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, como proceso esencial en el mecanismo de tolerancia predominante en los tejidos de la parte aérea. Efectivamente, como se ha discutido previamente (apartado D2), AtSOS2 regula indirectamente otros transportadores implicados en la compartimentación vacuolar de  $\text{Na}^+$  en condiciones de estrés salino, como la  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar, y los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , NHX1, y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , CAX1 (Qiu et al., 2004; Cheng et al., 2004; Batelli et al., 2007). Sin embargo, Quan et al., (2007), y posteriormente Lin et al., (2009), demostraron que SCABP8/CBL10, a pesar de no poseer motivos de miristoilación y palmitoilación en su N-terminal como AtCBL4, también reclutaba a SOS2 a la membrana plasmática, a la cual se ligaba mediante su interacción con un dominio altamente hidrofóbico de 25 aminoácidos en su N-terminal, activando así a SOS1 para extruir  $\text{Na}^+$  fuera de la célula. En favor de la hipótesis de una activación del antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática por dicho complejo, se ha demostrado que la actividad antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana vacuolar no se alteró en el mutante nulo *scabp8*, mientras que la de plasmalema fue reducida severamente (Quan et al., 2007). No obstante, no debe descartarse ninguno de los mecanismos propuestos y que CBL10 pueda regular la localización del evento de señalización para iniciar respuestas celulares específicas, como son la detoxificación del  $\text{Na}^+$  por acumulación en la vacuola o extrusión al apoplasto a través del plasmalema (Luan et al., 2009). Cualquiera que sea el mecanismo, parece muy probable que también en tomate deba existir un homólogo funcional de CBL10 que active la ruta SOS en la parte aérea en respuesta al estrés salino. Efectivamente, el putativo gen, *SICBL10* podría corresponderse con la secuencia SGN-U571422 obtenida de tomate (*International Solanaceae Genomics Project*,

<http://solgenomics.net/>) por ser la secuencia de mayor homología a AtCBL10 (Figura R32).

En el presente trabajo, la sobreexpresión constitutiva de SISOS3 promovió un mayor crecimiento de las raíces primarias en las líneas transgénicas que en las plantas no transformadas en presencia del estrés salino (Figura R30). También en trabajos previos se había observado que la sobreexpresión de AtSOS3 mejoraba la tolerancia a la salinidad de plántulas de *Arabidopsis* en ausencia de transpiración (en placa Petri), y en mayor medida que la sobreexpresión de AtSOS1, AtSOS2 y AtSOS3 juntas (Yang et al., 2008). Así mismo, la sobreexpresión de ZmCBL4 (SOS3 de maíz) en plántulas de *Arabidopsis* crecidas en las mismas condiciones mostró los mismos resultados (Wang et al., 2007). En ambos trabajos, dicha mejora se atribuía a la disminución de la absorción neta de Na<sup>+</sup> en las raíces de las plántulas por la sobreexpresión de SOS3 como miembro de la ruta SOS. Aunque en el presente trabajo no se ha medido la expresión de SISOS1 en este estadio, como en el caso de la sobreexpresión de SOS2 (apartado D2), también parece muy probable que el principal mecanismo de tolerancia implicado en este estadio deba provenir de la disminución de la absorción neta de Na<sup>+</sup>, por la actividad incrementada de la extrusión del catión desde la raíz al medio externo, mediada por la hiperactivación de la ruta SOS de tomate en las plantas transgénicas.

Sin embargo, cuando las plantas transgénicas crecieron en hidropónico durante 10 días con 120 mM de NaCl en condiciones de transpiración, sufrieron una mayor reducción del crecimiento que las no transformadas, sobre todo observable a nivel de la parte aérea. Ello conducía al marchitamiento y, en última instancia, a la muerte de las plantas transgénicas, mientras que las no transformadas sobrevivieron (Figura R28). Sorprendentemente, el análisis de los contenidos iónicos mostró que después de 5 días de tratamiento, las plantas transgénicas que sobreexpresaban SISOS3 presentaban una menor concentración de Na<sup>+</sup> en la parte aérea, tanto en tallo como en la hoja, y en contrapartida un mayor contenido de K<sup>+</sup> en la raíz y el tallo, sin

cambios significativos en las hojas (Figura R29). Aparentemente, ello podría deberse a una disminución de la absorción neta de  $\text{Na}^+$  en la planta por efecto de la actividad incrementada de la ruta SOS (Figura R31). Inesperadamente, las plantas transgénicas presentaron unos niveles incrementados de SISOS3 en el tallo y en las hojas en presencia del estrés salino (Figura R34), que se correlacionaba con un gran incremento en los niveles de expresión de SISOS1 en ambos tejidos (Figura R35).

Como se había discutido anteriormente, la expresión génica de SISOS3 en tomate, analizada por *Northern blot*, fue específica de la raíz y disminuía por efecto del estrés salino (ElJakaoui, 2009). Sin embargo, el análisis de la expresión por RT-PCR a tiempo real, técnica con una mayor capacidad de detección, mostró claramente que SISOS3 se expresaba mayoritariamente en raíces de plantas no transformadas, y en mucha menor medida, en los tallos y en las hojas, y que disminuía en todos los tejidos analizados por efecto del estrés salino (Figura R32). SOS3 (CBL4) es una de las 10 isoformas de CBLs presentes en *Arabidopsis*, arroz (Gong et al., 2004; Kolukisaoglu et al., 2004) y tomate (Figura R33). Por tanto, cabría la posibilidad de que alguna de ellas hubiera podido ser amplificada por RT-PCR a tiempo real en otros tejidos diferentes a la raíz, en vez de específicamente SISOS3. Sin embargo, la secuenciación del fragmento obtenido de RT-PCR a tiempo real reveló su exacta correspondencia con la secuencia específica de SISOS3 (Figura R32). Y además resultaba muy poco probable que los cebadores utilizados para la reacción de RT-PCR, que abarcaban una pequeña parte del extremo C-terminal y parte del extremo 3' no traducido (Cter-3'UTR), región claramente no conservada especialmente para el cebador reverso, pudieran amplificar alguna CBL diferente de SISOS3 (Figura R33).

Como la mayoría de las glicófitas, las plantas de tomate excluyen sales de los tejidos fotosintéticos de la hoja eliminando el  $\text{Na}^+$  desde la raíz, al tiempo que lo retienen en el tallo (Taleisnik y Grunberg, 1994; Guerrier, 1996). También, se ha discutido anteriormente (apartado D2), la importancia del antiportador SISOS1, no

sólo en la extrusión de  $\text{Na}^+$  al medio, sino también controlando la distribución de este ión a otros órganos de la planta (Olías et al 2009a y 2009b). Como se había sugerido previamente en *Arabidopsis* (Pardo et al., 2006), se ha postulado que la función de transporte de SOS1 en tomate debería de estar estrechamente coordinada con la de HKT1, un transportador específico de  $\text{Na}^+$  que retira el catión de la corriente xilemática y del apoplasto (apartado A5.3) para el control de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Olías et al., 2009b). De acuerdo con esta idea, SISOS1 podría mediar la transferencia del  $\text{Na}^+$  desde el parénquima xilemático al xilema, preferencialmente en las raíces, mientras que otro transportador, SIHKT1, podría mediar el flujo inverso (por ejemplo, la descarga de  $\text{Na}^+$  del xilema en las partes distales de la raíz y partes proximales del tallo). La acción coordinada de ambos determinaría en último término la cantidad de  $\text{Na}^+$  que deja las raíces, la que se retiene en el tallo o la que se transfiere a las hojas. En la parte aérea, la expresión de SISOS1 debería ser preponderante en tejidos jóvenes, ya que ello contribuiría a la exclusión de  $\text{Na}^+$  desde el citosol hacia el apoplasto, como único sistema de defensa frente a la acumulación de  $\text{Na}^+$  intracelular que poseen estas células de tejidos juveniles con un sistema vacuolar escasamente desarrollado. Mientras, SIHKT1 podría actuar predominantemente en hojas expandidas o maduras, cuyas células presentan un sistema vacuolar bien desarrollado, que puede acumular el  $\text{Na}^+$  retirado por HKT1 del xilema o del apoplasto.

En consonancia con la propuesta de Kim et al., (2007) anteriormente mencionada, una sobreexpresión de SOS3 en la hoja madura, podría prevenir o competir con la interacción de CBL10 con CIPK24/SOS2, para formar el complejo quinasa que se asociaría con los compartimentos vacuolares responsables del almacenamiento de sales y detoxificación de las células vegetales, como proceso esencial en el mecanismo de tolerancia predominante en los tejidos de la parte aérea. Al mismo tiempo, es posible que una mayor actividad extractora de  $\text{Na}^+$  (SOS1) a través del plasmalema de las células del mesófilo de hojas expandidas (y también del

tallo), al apoplasto o al mismo xilema, promovida por la expresión constitutiva e incrementada de SOS3, contribuya, por un lado, a incrementar las concentraciones locales en el apoplasto de dichas células, exacerbando todavía más el estrés por sal. También, que la actividad incrementada de SOS1 se contraponga a la acción de HKT1 impidiendo la entrada de  $\text{Na}^+$  en la célula de la hoja. En ambos casos, prevendría la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$  en membranas del sistema endosomal-vacuolar, impidiendo un buen ajuste osmótico con osmolitos inorgánicos baratos. En el presente trabajo, no se ha analizado la concentración de osmolitos ni medido el potencial osmótico en los diferentes tejidos. Sin embargo, esta hipótesis parece compatible con aquella que proviene de un estudio similar llevado a cabo en tomate que sobreexpresa el gen de levadura HAL1, un potente modulador de la homeostasis iónica en levadura (Muñoz-Mayor et al., 2008). Al igual que en plantas sobreexpresoras de SOS3, las plantas HAL1 no incrementaron su tolerancia a pesar de una mayor reducción de la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas. Esta menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas (y quizás en el tallo, que no fue medido) vino asociado a una menor acumulación de azúcares y ácidos orgánicos, para contrabalancear el potencial osmótico. Muñoz-Mayor et al (2008), concluyeron que esta capacidad de excluir  $\text{Na}^+$  causaba un problema osmótico adicional ya que la hoja (y quizás también las células del tallo) requerían un incremento de la síntesis de solutos orgánicos para mantener el balance osmótico, energéticamente mucho más caro.

Una hipótesis alternativa para la explicación de este fenotipo proviene del hecho de que SISOS3 no fuera capaz de rescatar totalmente el fenotipo hipersensible a la sal del mutante *sos3* de *Arabidopsis*, lo que indicaría una menor eficiencia en la activación de AtSOS1 por dicho complejo quinasa heterólogo (Eljakaoui, 2009). Similares resultados fueron obtenidos con OsCBL4 (Martínez-Atienza et al., 2007). Al mismo tiempo, ello podría arrojar alguna duda acerca de que SISOS3/SICBL4 pudiera ser el homólogo funcional de AtSOS3, no descartándose la posibilidad de

que SISOS3 represente a otra CBL diferente a CBL4, con capacidad de rescatar parcialmente el fenotipo hipersensible de *sos3*. A este respecto, la secuencia aminoacídica de SISOS3 exhibe también una alta homología con las de AtCBL1, AtCBL5, AtCBL9 y AtCBL8, si bien todas ellas, menores que con la de AtCBL4/AtSOS3 (Eljakaoui 2009). Además, excepto la última, todas poseen un motivo conservado de miristoilación, así como de palmitoilación en su N-terminal (Kolukisaoglu et al., 2004), necesarios para reclutar a sus respectivas CIPKs a la membrana para llevar a cabo su función (Batistic et al., 2008). También, como AtCBL4/SOS3, las proteínas AtCBL5, AtCBL1 y AtCBL9 se han localizado en la membrana plasmática formando los respectivos complejos quinasa CBL/CIPK (Batistic y Kudla, 2004; Xu et al., 2006; Li et al., 2006b, Batistic et al., 2008). Es conocido que cada CBL puede interactuar con una o varias CIPKs y cada CIPK puede interactuar con una o más CBLs, y alguna de ellas, compartiendo algunas CIPKs como diana común (Luan, 2009). Esta interacción específica y además solapada entre varios miembros de CBL/CIPK, reflejo de una especificidad funcional a la vez que redundante, forma una red compleja de CBL-CIPKs dentro del mecanismo de transducción de señales en plantas (Batistic y Kudla, 2004; Luan, 2009). Hasta la fecha, además de AtSOS3/CBL4, y SCABP8/CBL10, otras proteínas CBLs (CBL2, 1, 9 y 5) también se han implicado en la regulación de la homeostasis iónica (Kudla 2010; Cheong et al., 2010).

Todos estos resultados sugieren que una hiperactivación espacio-temporal de SISOS1 no específica de tejido o célula bajo condiciones salinas, por efecto de la sobreexpresión constitutiva de SISOS3, podría conducir a la alteración de la homeostasis del  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y por consiguiente, a la alteración del balance osmótico de células y tejidos en las plantas sobreexpresoras SOS3 de tomate. Finalmente, la utilización biotecnológica potencial de SOS3 en la mejora de la tolerancia requerirá del empleo del promotor endógeno, eventualmente de promotores específicos de tejido o bien de promotores inducibles que eviten una regulación inapropiada de la



homeostasis iónica (Corrado y Karali, 2009). En este sentido se ha demostrado que la sobreexpresión constitutiva del transportador de  $\text{Na}^+$  de la membrana plasmática HKT1;1 en *Arabidopsis* provoca la acumulación de este catión en la parte aérea y reduce notablemente el crecimiento de las plantas en condiciones salinas. Por el contrario la sobreexpresión específica de *HKT1;1* en células de la estela de la raíz conduce a una reducción de la transferencia de  $\text{Na}^+$  desde la raíz hacia el tallo, lo que determina un menor contenido de este catión en la parte aérea y una mayor tolerancia a la salinidad (Moller et al., 2009).

#### **D4. Plantas sobreexpresoras de SINhaD.**

Los transportadores de tipo NhaD constituyen un nuevo tipo de antiportadores de plantas que podrían tener una gran importancia en la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$ . PeNhaD1 de *Populus euphratica*, y McNhaD1 de *Messebrhyanthemum* son los únicos homólogos descritos en plantas superiores de esta familia que ha sido caracterizados hasta el momento, aunque muy parcialmente (Ottow et al., 2005; Cosentino et al., 2010). En *Arabidopsis*, el análisis de la secuencia genómica predice dos miembros de la subfamilia NhaD (NHD1 y NHD2), aún no caracterizados. Para el del musgo *Physcomitrella* (PpNhaD1) se ha propuesto una compleja función de antiporte  $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+-\text{K}^+$  (Barrero-Gil et al., 2007). En nuestro laboratorio se había aislado un gen de tomate perteneciente a la familia NhaD (Olías et al., 2009c). Esta proteína se ha localizado en los cloroplastos de hoja, y orgánulos plastidiales de tallo, raíz y fruto, sugiriendo que este transportador puede jugar un papel importante en la homeostasis iónica y control de pH de los plastidios de tejidos verdes y no verdes (Olías et al 2009c). La funcionalidad de SINhaD *in planta* y su implicación en la tolerancia a la salinidad, se viene estudiando en nuestro laboratorio mediante silenciamiento génico postranscripcional (PTGS).

En este trabajo, se ha pretendido como un cuarto objetivo, llevar a cabo la sobreexpresión de SINhaD, con objeto de evaluar el papel de este transportador en el control de la homeostasis de  $K^+$  y  $Na^+$  y su potencial biotecnológico en mejora de la tolerancia del tomate a la salinidad. Hasta el momento, y debido a la extensión de tiempo que implica este tipo de experimentación y a la limitación de tiempo que impone este trabajo de Tesis Doctoral, sólo se ha podido generar líneas transgénicas T3 homocigotas y mono-locus para el transgen. El análisis del fenotipo en función de los tratamientos estudiados se ha llevado a cabo en ensayos en placa en ausencia de transpiración, comparando líneas no transformadas con dos líneas transgénicas (L5-2-1 y L7-2-1), que habían sido determinadas, mediante análisis de tipo *Southern* y segregación mendeliana de la resistencia a higromicina (Figuras R36, R37 y R38, Tabla R4). En estos experimentos preliminares en placa, la reducción del crecimiento de la raíz por efecto del NaCl fue un poco menor, aunque significativa, en las líneas transgénicas con respecto a las no transformadas (Figura 39), sugiriendo que la sobreexpresión de SINhaD1 incrementa en alguna medida la tolerancia de las plantas transgénicas al NaCl en estadios tempranos del desarrollo. Los transportadores de tipo NhaD son altamente homólogos a los de halobacterias, que se han caracterizado como antiportadores  $Na^+(Li^+)/H^+$  (Mäser et al., 2002b). Puesto que la función de NhaD, no está aún claramente establecida en plantas, toda interpretación resulta altamente especulativa. A este respecto, se ha descrito en la caña común la formación de gránulos de almidón en las células parenquimáticas de la base del tallo en respuesta al estrés salino, que adsorben grandes cantidades de  $Na^+$  y conlleva una disminución del contenido de  $Na^+$  en el citosol, y de la savia xilemática (Kanai et al., 2007). Los gránulos de almidón se forman y acumulan en los plastidios, por lo que éstos podrían constituir importantes reservorios intracelulares de sales. La actividad de SINhaD podría estar implicada en el transporte de sales al plastidio, constituyendo otro mecanismo de control de transporte de  $Na^+$  a larga distancia, probablemente, en coordinación con HKT1, que retiraría  $Na^+$  del xilema para ser acumulado en los

plastidios de las células parenquimáticas del xilema en tallo o del apoplasto de células del mesófilo de hojas expandidas.



## **VI. CONCLUSIONES**



1. Se han obtenido plantas transgénicas de *S. lycopersicum* cv. MicroTom mono-locus y homocigóticas para el transgen *LeNHX2* que codifica un antiportador  $K^+/H^+$  de tomate de localización prevacuolar/endosomal. Las líneas transgénicas mostraron una mayor sobreexpresión de la proteína LeNHX2 y una mayor actividad antiportadora  $Na^+/H^+$  y  $K^+/H^+$  en vesículas endosomales de raíces de plantas cultivadas tanto en ausencia como en presencia de NaCl, lo que indica una mayor capacidad para la compartimentación de  $Na^+$  y  $K^+$  en el sistema endosomal.
2. La sobreexpresión de LeNHX2 provocó una clara disminución del crecimiento de la parte aérea de las plantas de tomate cultivadas en ausencia de  $K^+$  al tiempo que incrementó los niveles de expresión del transportador de  $K^+$  de alta afinidad, LeHAK5. No obstante, el aumento en la expresión de LeHAK5 no fue suficiente para contrarrestar el déficit de  $K^+$  citoplásmico causado por la alta compartimentación del catión en las plantas sobreexpresoras de LeNHX2. En consecuencia, el  $K^+$  quedaría fisiológicamente inaccesible, lo que produciría en última instancia la inhibición del crecimiento de las líneas transgénicas. Por otra parte, la sobreexpresión de LeNHX2 incrementó la tolerancia a la salinidad, lo cual era probablemente debido a una mejor homeostasis de  $K^+$  que permitiría mantener el balance osmótico, sin necesidad de una mayor acumulación intracelular de  $Na^+$ . Al mismo tiempo, las reservas endosomales de  $K^+$  podrían utilizarse para mantener una óptima razón  $K^+/Na^+$  en el citosol.
3. Se han obtenido plantas transgénicas de *S. lycopersicum* cv. MicroTom mono-locus y homocigóticas para el transgen *SISOS2*, que codifica la proteína quinasa SICIPK24. La sobreexpresión de SISOS2 trajo consigo un incremento de la expresión del gen SISOS1 endógeno de la raíz que se correlacionaba con una mayor actividad antiportadora  $Na^+/H^+$  en vesículas de membrana plasmática aisladas de las raíces de las plantas transgénicas cultivadas tanto en ausencia como en presencia de NaCl, lo que provocaría en las plantas transgénicas una mayor capacidad para la extrusión de  $Na^+$  al medio externo y/o a la corriente xilemática.

4. La sobreexpresión de *SISOS2* incrementó la tolerancia a la salinidad de las plantas de tomate, tanto en estadios muy jóvenes de desarrollo en ausencia de transpiración como en estadios de desarrollo vegetativo en condiciones de transpiración. Esta mayor tolerancia se manifestó en una menor clorosis foliar, una mayor velocidad de crecimiento relativo y una floración más temprana que permitió, en última instancia, una mayor producción de frutos. Al nivel bioquímico, el incremento en la tolerancia a la salinidad de las plantas sobreexpresoras de *SISOS2* se asocia principalmente a la regulación de los transportadores de  $\text{Na}^+$  de la membrana plasmática y de los transportadores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de los compartimentos endosomal-vacuolar (*SISOS1*, *LeNHX4* y quizás *LeNHX2*), responsables de mantener la homeostasis celular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .
  
5. Se han obtenido plantas transgénicas de *S. lycopersicum* cv. MicroTom mono-locus y homocigóticas para el transgen *SISOS3*, que codifica la proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$ , *SICBL4*. Aunque *SISOS3* es una proteína que se expresa mayoritariamente en la raíz, la sobreexpresión constitutiva de *SISOS3* ocasionó un incremento de transcritos, no solo en la raíz, sino también en el tallo y la hoja de las plantas transgénicas, especialmente bajo condiciones de estrés salino. Ello trajo consigo un incremento de la expresión del gen *SISOS1* endógeno en todos los tejidos indicados, independientemente de la presencia de  $\text{NaCl}$  en el medio de cultivo.
  
6. La sobreexpresión constitutiva de *SISOS3* promovió un mayor crecimiento de las raíces primarias en condiciones de estrés salino en estadios jóvenes y en ausencia de transpiración. Sin embargo, las plantas transgénicas cultivadas en hidropónico en condiciones de transpiración, sufrieron una fuerte reducción del crecimiento que conducía al marchitamiento y, en última instancia, a la muerte. Estos resultados sugieren que una hiperactivación espacio-temporal de *SISOS1* no específica de tejido o célula bajo condiciones salinas podría conducir a la alteración de la homeostasis del  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y por consiguiente, a la alteración del balance osmótico de células y tejidos en las plantas sobreexpresoras de *SISOS3*. Por tanto, la utilización



biotecnológica potencial de SISOS3 en la mejora de la tolerancia del tomate a la salinidad requerirá del empleo del promotor endógeno, de promotores específicos de tejido o bien de promotores inducibles que eviten una regulación inapropiada de la homeostasis iónica.

7. Se han obtenido plantas transgénicas de *S. lycopersicum* cv. MicroTom mono-locus y homocigóticas para el transgen SINhaD, que codifica un antiportador putativo  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , aun no bien caracterizado en plantas superiores y que en estudios previos de nuestro laboratorio se ha localizado en los cloroplastos de hoja y plastidios de tallo, raíz y fruto, lo que sugiere su implicación en la homeostasis iónica y control de pH de los plastidios de tejidos verdes y no verdes. Los resultados preliminares de crecimiento en ausencia de transpiración parecen indicar que la sobreexpresión de SINhaD incrementa en alguna medida la tolerancia de las plantas transgénicas al NaCl en estadios tempranos del desarrollo.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



**A bebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC (2003)** Tolerance of Mannitol accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* **131**: 1748–1755.

**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.

**Ahmad R, Kim Y-H, Kim M-D, Kwon S-Y, Cho K, Lee H-S, Kwak S-S (2010)** Simultaneous expression of choline oxidase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in potato plant chloroplasts provides synergistically enhanced protection against various abiotic stresses. *Physiol Plant.* **138**: 520-533.

**Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF (2010)** Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta.* **231**: 1237-1249.

**Al-Doss AA, Smith SE (1998)** Registration of AZ-97MEC and AZ-97MEC-ST very non-dormant alfalfa germplasm pools with increased shoot weight and differential response to saline irrigation. *Crop Sci.* **38**: 568.

**Alemán F, Nieves-Cordones M, Martínez V, Rubio F (2009)** Differential regulation of the *HAK5* genes encoding the high-affinity K<sup>+</sup> transporters of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp Bot.* **65**: 263-269.

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

**Amtmann A, Fischer M, Marsh EL, Stefanovic A, Sanders D, Schachtman DP (2001)** The wheat cDNA *LCT1* generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiol.* **126**: 1061–1071.

**An B-Y, Luo Y, Li J-R, Qiao W, Zhang X-S (2008)** Expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene of alfalfa enhances salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Acta Agron Sin.* **34**: 557–564.

**An R, Chen QJ, Chai MF, Lu PL, Su Z, Qin ZX, Chen J, Wang XC (2007)** AtNHX8, a member of the monovalent cation: proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li/H antiporter. *Plant J.* **49**: 718-728.

**Anderson SE, Bastola DR, Minocha SC (1998)** Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Physiol.* **116**: 299-307.

**Apel K, Hirt H (2004)** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* **55**: 373-99.

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

**Apse MP, Blumwald E (2007)** Na<sup>+</sup> transport in plants. *FEBS Letters.* **581**: 2247-2254.

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

**Aranda MN (2010)** Caracterización funcional de transportadores KEA de *Arabidopsis*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. 220 pp.

**Ardie SW, Xie L, Takahashi R, Liu S, Takano T (2009)** Cloning of a high-affinity K<sup>+</sup> transporter gene PutHKT2;1 from *Puccinellia tenuiflora* and its functional comparison with OsHKT2;1 from rice in yeast and *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* **60**: 3491-3502.

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

**Ashraf M (1994)** Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci.* **13**:17-42.

**Ashraf M (2009)** Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol Adv.* **27**: 84-93.

**Ashraf M, Akram NA (2009)** Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. *Biotechnol Adv.* **27**: 744-752.

**Ashraf M, Athar HR, Harris PJC, Kwon TR (2008)** Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Adv Agron.* **97**: 45-110.

**Ashraf M, Foolad MR (2007)** Roles, of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot.* **59**: 206-216.

**Ashraf M, O'Leary JW (1996)** Responses of some newly developed salt-tolerant genotypes of spring wheat to salt stress. Yield components and ion distribution. *J Agron Crop Sci.* **176**: 91-101.

- Ashraf M, Ozturk M, Athar HR (2009)** Salinity and water stress: Improving crop efficiency. tasks for vegetation sciences, **44**. Springer Science. ISBN 978-1-4020-9064-6.
- Ashley MK, Grant M, Grabov A (2006)** Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *J Exp Bot.* **57**: 425–436.
- Athar HR, Ashraf M (2009)** Strategies for crop improvement against salt and water stress: An overview. p. 1–16. In M. Ashraf, M. Ozturk, and H.R. Athar (ed.) Salinity and water stress: Improving crop efficiency, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- Auge GA, Perelman S, Crocco, CD, Sánchez RA, Botto JF (2009)** Gene expression analysis of light-modulated germination in tomato seeds. *New Phytol.* **183**: 301-314.
- Azaizeh H, Steudle E (1991)** Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.). *Roots Plant Physiolog.* **97**: 1136-1145
- Balague C, Lin BQ, Alcon C, Flottes G, Malmstrom S, Kohler C, Neuhaus G, Pelletier G, Gaymard F, Roby D (2003)** HLM1, an essential signalling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel family. *Plant Cell.* **15**: 365–379.
- Ballesteros E, Blumwald E, Donaire JP, Belver A (1997)** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in tonoplast enriched vesicles isolated from sunflower roots induced by salt stress. *Physiol Plant.* **99**: 328-334.
- Ballesteros E, Donaire JP, Belver A (1996)** Effects of salt stress on H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Physiol Planta.* **97**: 259-268.
- Bao A-K, Wang S-S, Wu G-G, Xi J-J, Zhang J-L, Wang C-M (2009)** Overexpression of the *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science.* **176**: 232-240.
- Barkla BJ, Zingarelli L, Blumwald E, Smith J (1995)** Tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity and its energization by the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.* **109**: 549-556.
- 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 Exp Botany.* **58**: 2839-2849.
- Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, Schumaker KS, Grillo S, Zhu J-K (2007)** SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol Cell Biol.* **27**: 7781-7790.

**Batistic O, Kudla J (2004)** Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta*. **219**: 915-924.

**Batistic O, Sorek N, Schültke S, Yalovsky S, Kudla J (2008)** Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca<sup>2+</sup> signaling complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **20**: 1346-1362.

**Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008)** The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*. **148**: 6-24.

**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 Letters*. **482**: 19-24.

**Benito B, Garciadeblas 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, Véry A-A, Sentenac H, Casse F (2003)** Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J*. **22**: 2004-2014.

**Bertl A, Reid JD, Sentenac H, Slayman CL (1997)** Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *J Exp Bot*. **48**: 405-413

**Bhandal IS, Malik CP (1988)** Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *Int Rev Cytol*. **110**: 205-254.

**Bhattacharya RC, Maheswari M, Dineshkumar V, Kirti PB, Bhat SR, Chopra VL (2004)** Transformation of *Brassica oleracea* var. capitata with bacterial *betA* gene enhances tolerance to salt stress. *Sci Hortic*. **100**: 215-27.

**Bies-Etheve N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M (2008)** Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. **67**: 107-124.

**Blahe G, Stelzl U, Spahn CMT, Agrawal RK, Frank J, Nierhaus KH (2000)** Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods Enzymol*. **317**: 292-309.

**Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000)** Sodium transport in plant cells. *Biochem Biophys Acta*. **1465**: 140-151.



- 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.
- Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, Van den Dries N, Maurel C (2005)** Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* **139**:790-805.
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
- Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1998)** Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends Plant Sci.* **3**: 411-412.
- Bressler E, Hoffman GC (1986)** Irrigation Management for soils salinity control: theories and tests. *Soil Sci Am J*: **50**:1552-1560
- Brett CL, Donowitz M, Rao R (2005a)** Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell.* **288**: C223-C239.
- Brett CL, Tukaye DN, Mukherjee S, Rao R (2005b)** The yeast endosomal  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell.* **16**: 1396-1405.
- Brini F, Gaxiola RA, Berkowitz GA, Masmoudi (2005)** Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiol Biochem.* **43**: 347-354
- Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz GA, Masmoudi K (2007)** Overexpression of wheat  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter TNHX1 and  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase TVP1 improve salt - and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J Exp Bot.* **58**: 301-308.
- Byrt CS, Munns R (2008)** Living with salinity. *New Phytol.* **179**: 901–903.
- Byrt CS, Platten JD, Spielmeyer W, James RA, Lagudah ES, Dennis ES, Tester M, Munns R (2007)** HKT1;5-like cation transporters linked to  $\text{Na}^+$  exclusion loci in wheat, *Nax2* and *Kna1*. *Plant Physiol.* **143**:1918–1928.
- Capell T, Bassie L, Christou P (2004)** Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**: 9909–9914.

**Campbell SA, Close TJ (1997)** Dehydrins: genes, proteins, and association with phenotypic. Salt Stress traits. *New Phytol.* **137**: 61-74.

**Cellier F, Conejero G, Ricaud L, Luu DT, Lepetit M, Gosti F, Casse F (2004)** Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Plant J.* **39**: 834–846.

**Chauhan S, Forsthoefel N, Ran Y, Quigley F, Nelson DE, Bohnert HJ (2000)** Na<sup>+</sup>/myo-inositol symporters and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* **24**: 511-522.

**Cheeseman JM (1988)** Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* **87**: 547-550.

**Chen LH, Zhang B, Xu ZQ (2008)** Salt tolerance conferred by overexpression of *Arabidopsis* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene AtNHX1 in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Transgenic Res.* **17**: 121-132.

**Chen M, Chen Q-J, Niu X-G, Zgang R, Lin H-Q, Xu C-Y, Wang X-C, Wang G-Y, Chen J (2007b)** Expression of OsNHX1 gene in maize confers salt tolerance and promotes plant growth in the field. *Plant Soil Environ.* **53**: 490–498.

**Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren MG, Newman IA, Shabala S (2007a)** Root plasma membrane transporters controlling K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiol.* **145**: 1714-1725.

**Cheng NH, Pittman JK, Shigaki T, Hirschi KD (2002)** Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/cation antiporter. *Plant Physiol.* **128**:1245-1254.

**Cheng NH, Pittman JK, Zhu JK, Hirschi KD (2004)** The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 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.

**Cheong YH, Sung SJ, Kim B-G, Pandey GK, Cho J-S, Kim K-N, Luan S (2010)** Constitutive overexpression of the calcium sensor CBL5 confers osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Cells.* **29**: 159-165.

**Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK (2005)** Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science.* **45**: 437–448.

**Chung J-S, Zhu J-K, Bressan RA, Hasegawa PM, Shi H (2008)** Reactive oxygen species mediate Na<sup>+</sup>-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.
- Clives J (2009)** ISAAA - International Service for the Acquisition Of Agri-biotech Applications - Report on Global Status of Biotech/GM Crops. <http://www.isaaa.org>
- Collins NC, Tardieu F, Tuberosa R (2008)** Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: Where do we stand?. *Plant Physiol*. **147**:469–86.
- Corrado G, Karali M (2009)** Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotechnol Adv*. **27**: 733-743.
- Cortina C, Culianez-Macia FA (2005)** Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci*. **169**: 75–82.
- Cosentino C, Fischer-Schliebs E, Bertl A, Thiel G, Homann U (2010)** Na(+)/H(+) antiporters are differentially regulated in response to NaCl stress in leaves and roots of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New phytol*. **186**: 669–680.
- Cramer GR (2002)** Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. *Funct. Plant Bio*. **29**:561–567.
- Cramer GR, Alberico GJ, Schmidt C (1994)** Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. *Aust J Plant Physiol*. **21**: 675–692.
- Cuartero J, Bolarin MC, Asins MJ, Moreno V (2006)** Increasing salt tolerance in the tomato. *J Exp bot*. **57**: 1045-1058.
- Cuartero J, Fernández-Muñoz R (1999)** Tomato and salinity. *Hort Sci*. **78**: 83-125.
- Cuartero J, Yeo AR, Flowers TJ (1992)** Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *New Phytol*. **121**: 63-69.
- Cuin TA, Miller AJ, Laurie SA, Leigh RA (2002)** Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *J. Exp. Bot*. **54**:657–661.
- Dajic Z (2006)** Salt stress. En K.V. Madhava Rao, A.S. Ratha Vendra y K. Janardhan Reddy (Eds), *Physiology and Molecular Biology of stress tolerance*. pp. 41-101 Dordrech: Springer.
- Dalal M, Tayal D, Chinnusamy V, Bansal KC (2009)** Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *J Biotechnol*. **139**: 137-145.

- Darley CP, van Wuytswinkel OC, van der Woude K, Mager WH, de Boer AH (2000)** *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Biochem J.* **351**: 241–249.
- Davenport RJ, James RA, Zakrisson-Plogander A, Tester M, Munns RJ (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<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* **30**: 497–507.
- Davies WJ, Kudoyarova G, Hartung W (2005)** Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *J. Plant Growth Regulation.* **24**: 285–295.
- De Boer A, Volkov V (2003)** Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. *Plant Cell Environ.* **26**: 87-101
- Demidchik V, Davenport RJ, Tester M (2002)** Nonselective cation channels in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **53**: 67-107.
- Demidchik B, Essah PA, Tester M (2004)** Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta.* **219**: 167–175.
- Demidchik V, Maathuis FJM (2007)** Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol.* **175**: 387-404.
- 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.
- Dibrov P, Rimon A, Dzioba J, Winogrodzki A, Shalitin Y, Padan E (2005)** 2-Aminoperimidine, a specific inhibitor of bacterial NhaA Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Letters.* **579**: 373-378.
- Dobrenz AK (1999).** Salt-tolerant alfalfa. US: Agripro Seeds, Inc., Shawnee Mission, KS.
- Dobrenz AK, Robinson DL, Smith SE, Poteet DC (1989)** Registration of AZ-germ salt-II nondormant alfalfa germplasm. *Crop Sci.* **29**: 493.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991)** A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research.* **19**: 1349.
- Ehsanzadeh P, Nekoonam MS, Azhar JN, Pourhadian H, Shaydaee S (2009)** Growth, chlorophyll, and cation concentration of tetraploid wheat on a solution high in sodium chloride salt: Hulled versus free-threshing genotypes. *J. Plant Nutr.* **32**: 58–70.

- ElJakaoui Z (2009)** Homeostasis iónica en condiciones de estrés salino: identificación funcional de la ruta SOS en tomate. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 240 pp
- Ellul P, Garcia-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* Mill.) is genotype and procedure dependent TAG. *Theor Appl Genet.* **106**: 231-238.
- Essah PA, Davenport RJ, Tester M (2003)** Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 307–318.
- Estañ MT, Martínez-Rodríguez MM, Perez-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.
- Farazi TA, Waksman G, Gordon JI (2001)** The Biology and Enzymology of Protein N-Myrystoylation. *J Biol Chem.* **276**: 39501-39504
- Flowers TJ (1988)** Chloride as a nutrient and as an osmoticum. In: Tinker B, Läuchli A, eds. *Advances in plant nutrition, vol 3*. New York: Praeger, 55–78.
- Flowers TJ (2004)** Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* **55**: 307-319.
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977)** The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol;* **28**: 89-121.
- Foolad MR (2004)** Recent Advances in Genetics of Salt Tolerance in Tomato. *Plant Cell Tiss Org Cult.* **76**: 101–119.
- Foolad MR (2007)** Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *Internat J Plant Genom.* doi:10.1155/2007/64358.
- Forrest KL, Bhave M (2007)** Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Funct Integr Genomics.* **7**: 263-289.
- Foyer CH, Noctor G (2005)** Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* **17**:1866-1875.
- Fricke W, Akhiyarova G, Veselov D, Kudoyarova G (2004)** Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate response to salinity in barley leaves. *J Exp Bot.* **55**: 1115-1123.
- Fricke W, Akhiyarova G, Wei W, Alexandersson E, Miller A, Kjellbom PO, Richardson A, Wojciechowski T, Schreiber L, Veselov D, Kudoyarova G, Volkov V (2006)** The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *J Exp Bot.* **57**: 1079-1095.

**Fricke W, Peters WS (2002)** The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiol.* **129**: 374–88

**Frohnmeier H, Grabov A, Blatt MR (1998)** A role for the vacuole in auxin-mediated control of cytosolic pH by Vicia mesophyll and guard cells. *Plant J.* **13**: 109-116.

**Fu, HH, Luan S (1998)** AtKUP1: a dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **10**: 63–73.

**Fukuda A, Chiba K, Maeda M, Nakamura A, Maeshima M, Tanaka Y (2004a)** Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase, H<sup>+</sup>-ATPase subunit A, and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from barley. *J Exp Bot.* **55**: 585-594.

**Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y (2004b)** Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* **45**: 146-159.

**Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y (1999)** Molecular cloning and expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochem Biophys Acta.* **1446**: 149-155.

**Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Yamaguchi T, Saito N, Iida S (2000)** Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature.* **407**: 581.

**Galvez FJ (2009)** Caracterización de la familia de antiportadores LeNHX de tomate. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. 328 pp.

**García A, Rizzo CA, Ud-Din J, Bartos SL, Senadhira D, Flowers TJ, Yeo AR (1997)** Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanisms of sodium:potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant Cell Environ.* **20**: 1167–1174.

**Garciadeblás B, Haro R, Benito B (2007)** Cloning of two SOS1 transporters from the seagrass *Cymodocea nodosa*. SOS1 transporters from *Cymodocea* and *Arabidopsis* mediate potassium uptake in bacteria. *Plant Mol Biol.* **63**: 479-490.

**Garciadeblás B, Senn ME, Bañuelos MA, Rodríguez-Navarro A (2003)** Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* **34**: 788–801.

**Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala APD, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ (2002)** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 15898–15903.

**Gao M, Sakamoto A, Miura K, Murata N, Sugiura A, Tao R (2000)** Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with a bacterial gene for choline oxidase. *Mol Breed.* **6**:501-510.

- Gao X, Ren Z, Zhao Y, Zhang H (2003)** Overexpression of SOD2 increases salt tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**:1873-1881.
- Gassmann W, Rubio F, Schroeder JI (1996)** Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J.* **10**: 869-882.
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001)** Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 11444-11449.
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grifasi P, Alper 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.
- Ge L-F, Chao D-Y, Shi M, Zhu M-Z, Gao J-P, Lin H-X (2008)** Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OstTPPI* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta.* **228**: 191-201.
- Gelburd D (1985)** Managing salinity lessons from the past. *J Soil Water Conservation.* **40**: 329-331.
- Gierth M, Mäser P (2007)** Potassium transporters in plants--involvement in K<sup>+</sup> acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters.* **581**: 2348-2356.
- Gill SS, Tuteja N (2010)** Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav.* **5**: 26-33.
- Gobert A, Park G, Amtmann A, Sanders D, Maathuis, FJM (2006)** *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *J Exp Bot.* **57**: 791-800.
- Goel D, Singh AK, Yadav V, Babbar SB, Bansal KC (2010)** Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma.* **245**:133-141.
- Gogstad GO and Krutnes MB (1982)** Measurement of protein in cell suspensions using the Coomassie brilliant blue dye-binding assay. *Anal Biochem.* **126**: 355-359.
- Golldack D, Su H, Quigley F, Kamasani UR, Munoz-Garay C, Balderas E, Popova OV, Bennett J, Bohnert HJ, Pantoja O (2002)** Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *Plant J.* **31**: 529-542.
- 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.

**Gong Q, Li P, Ma S, Indu-Rupassara S, Bohnert HJ (2005)** Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **44**: 826-839.

**Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005)** LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J.* **388**: 151-157.

**Greenway H, Munns R (1980)** Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu Rev Plant Physiol.* **31**: 149-190.

**Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Velange-Macherel MH, Grunwald D, Macherel D (2005)** Identification in pea seed mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.* **137**: 157-167.

**Groppa MD, Benavides MP (2008)** Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids.* **34**: 35-45.

**Guerrier G (1996)** Fluxes of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>, and osmotic adjustment in *Lycompersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* during short- and long-term exposures to NaCl. *Physiol. Plant.* **97**: 583-591.

**Guoa K-M, Babourina O, Rengel Z (2009)** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity of the SOS1 gene: lifetime imaging analysis and electrophysiological studies on *Arabidopsis* seedlings. *Physiologia Plantarum.* **137**: 155-165.

**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, 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.

**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.

**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**: 3735-3737.

**Hall D, Evans AR, Newbury JJ, Pritchard J (2006)** Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* **57**: 1201-1210.



- Hamada A, Shono M, Xia T, Ohta M, Hayashi Y, Tanaka A, Hayakawa T (2001)** Isolation and characterization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol Biol.* **46**: 35-42.
- Hanana M, Cagnac O, Yamaguchi T, Hamdi S, Ghorbel A, Blumwald E (2007)** A Grape berry (*Vitis vinifera* L.) Cation/proton antiporter is associated with berry ripening. *Plant Cell Physiol.* **48**: 804-811.
- Haro R, Bañuelos MA, Senn MAE, Barrero-Gil J, Rodríguez-Navarro A (2005)** HKT1 mediates sodium uniprot in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol.* **139**: 1495-1506.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ (2000)** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio.* **51**: 463-499.
- Hayashi H, Alia L, Mustardy P, Deshnum I, Murata N (1997)** Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* **12**:133-142.
- Hayashi H, Sakamoto A, Nonaka H, Chen THH, Murata N (1998)** Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase. *J Plant Res.* **111**: 357-362.
- He C, Yan J, Shen G, Fu L, Holaday AS, Auld D, Blumwald E, Zhang H (2005)** Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fibre yield in the field. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1848-1854.
- Heidari M, Mesri F (2008)** Salinity effects on compatible solutes, antioxidants enzymes and ion content in three wheat cultivars. *Pak J Biol Sci.* **11**: 1385-1389.
- Higinbotham N (1973)** Electropotentials of plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **24**: 25-46.
- Hmida-Sayari A, Gargouri-Bouزيد R, Bidani A, Jaoua L, Savoure A, Jaoua S (2005)** Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Sci.* **169**:746-752.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950)** The water culture method for growing plant without soil. *California Agric Expt Stn Bull.* **47**.
- 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.

**Hollington PA (2000)** Technological breakthroughs in screening/breeding wheat varieties for salt tolerance. In: Gupta SK, Sharma SK, Tyagi NK, editors. Proceedings of the National Conference 'Salinity Management in Agriculture. Central Soil Salinity Research Institute; 273-289.

**Holmstrom KO, Somersalo S, Mandal A, Palva ET, Welin B (2000)** Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J Exp Bot.* **51**: 177-185.

**Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Pal D, Verma S (2000)** Removal of feedback inhibition of  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* **122**: 1129-1136.

**Horie T, 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  $\text{Na}^+$  influx component into  $\text{K}^+$ -starved roots for growth. *EMBOJ.* **26** :300-314.

**Horie T, Hauser F, Schroeder FJ (2009)** HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends Plant Sci.* **14**: 660-668.

**Horie T, Schroeder JI (2004)** Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol.* **136**: 2457-2462.

**Horie T, Yoshida K, Nakayama H, Yamada K, Oiki S, Shinmyo A (2001)** Two types of HKT transporters with different properties of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* **27**: 129-138.

**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.

**Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002a)** Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol.* **130**: 618-626.

**Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC, Chan MT (2002b)** Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol.* **129**: 1086-1094.

**Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L (2008)** Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol.* **67**: 169-181.

- Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA (2000)** Genetic engineering of glycine betaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* **122**: 747-756.
- Huang S, 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<sup>+</sup> transport, and salt tolerance. *J Exp Bot.* **59**: 927-937.
- Ishitani M, Liu JP, Halfter U, Kim CS, Shi WM, Zhu J-K (2000)** SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell.* **12**:1667-1677.
- Jabnourne M, Espeout S, Mieulet D, Fizames C, Verdeil JL, Conejero G, Rodríguez-Navarro A, Sentenac H, Guiderdoni E, Abdelly C, Very AA (2009)** Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. *Plant Physiol.* **150**: 1955-1971.
- James RA, Davenport RJ, Munns R (2006)** Physiological characterization of two genes for Na<sup>+</sup> exclusion in durum wheat, Nax1 and Nax2. *Plant Physiol.* **142**: 1537-1547.
- Janicka-Russak M, Kabala K, Młodzieńska E, Klobus G (2010)** The role of polyamines in the regulation of the plasma membrane and the tonoplast proton pumps under salt stress. *J Plant Physiol.* **167**: 261-269.
- Jeschke WD (1984)** K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> 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.
- Johnson DW, Smith SE, Dobrenz AK (2001)** Registration of AZ-90NDC-ST nondormant alfalfa germplasm with improved forage yield in saline environments. *Crop Sci.* **31**: 1098-1099.
- Kader MdA, Lindberg S (2010)** Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signal Behav.* **5**: 233-238.
- Kader MdA, Seidel T, Golldack D, Lindberg S (2006)** Expressions of OsHKT1, OsHKT2 and OsVHA are differently regulated under NaCl stress in saltsensitive and salt-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J Exp Bot.* **57**: 4257-4268.
- Kagami T, Suzuki M (2005)** Molecular and functional analysis of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene of *Rosa hybrida*. *Genes Genet Syst.* **80**: 121-128.

**Kanai M, Higuchi K, Hagihara T, Konishi T, Ishii T, Fujita N, Nakamura Y, Maeda Y, Yoshida M, Tadano T (2007)** Common reed produces starch granules at the shoot base in response to salt stress. *New Phytologist*. **176**: 572-580.

**Kang'ethe W, Aimanova KG, Pullikuth AK, Gill SS (2007)** NHE8 mediates amiloride-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange across mosquito Malpighian tubules and catalyzes  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  transport in reconstituted proteoliposomes. *Am J Physiol Renal Physiol*. **292**: F1501-F1512.

**Kaplan B, Sherman T, Fromm H (2007)** Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters* **581**: 2237-2246.

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

**Katsuhara M, Hanba Y (2008)** Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP Aquaporins) as water and  $\text{CO}_2$  transporters. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. **456**: 687-691.

**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.

**Kerkeb B, Donaire JP, Rodríguez-Rosales, MP (2001)** Tolerance to NaCl induces changes in plasma membrane lipid composition, fluidity and  $\text{H}^+$ -ATPase activity of tomato calli. *Physiol Plantarum*. **111**: 483-490.

**Kiegle E, Moore C, Haseloff J, Tester M, Knight M (2000)** Cell-type specific calcium responses to drought, NaCl, and cold in *Arabidopsis* root: a role for endodermis and pericycle in stress signal transduction. *Plant J*. **23**: 267-278

**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, Miao CH, Hu CAA, Verma DPS (1995)** Overexpression of  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*. **108**: 1387-1394.

**Knight H (2000)**. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol*. **192**: 269-324.

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

- Kolukisaoglu U, Weini 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.
- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K (2010)** Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell.* **22**: 541-563.
- Kumria R, Rajam MV (2002)** Ornithine decarboxylase transgene in tobacco affects polyamines, in vitro-morphogenesis and response to salt stress. *J Plant Physiol.* **159**: 983-990.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lakhdar A, Rabhi M, Ghnaya T, Montemurro F, Jedidi N, Abdelly C (2009).** Effectiveness of compost use in salt-affected soil. *J Hazard Mater.* **171**: 29-37.
- Lal S, Gulyani V, Khurana P (2008)** Overexpression of HVA1 gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*). *Transgenic Res.* **17**: 651-663.
- 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.
- Laurie S, Feeney KA, Maathuis FJM, Heard PJ, Brown SJ, Leigh RA (2002)** A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* **32**: 139-149.
- Lee J-T, Prasad V, Yang PT, Wu JF, David Ho TH, Charng YY, Chan MT (2003)** Expression of *Arabidopsis* CBF1 regulated by an ABA/stress inducible promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without affecting yield. *Plant Cell Environ.* **26**: 1181-1190.
- 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.
- Leidi EO, Barragán V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz MT, Cubero B, Fernández JA, Bressan RA, Hasegawa PM, Quintero FJ, Pardo JM (2010)** The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J.* **61**: 495-506.
- Leng Q, Mercier RW, Hua B-G, Fromm H, Berkowitz GA (2002).** Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol.* **128**: 400-410.

**Li HT, Liu H, Gao XS, Zhang H (2009).** Knock-out of *Arabidopsis* AtNHX4 gene enhances tolerance to salt stress. *Biochem Biophys Res Commun.* **382**: 637-641

**Li JY, He XW, Xu L, Zhou J, Wu P, Shou HX, Zhang FC (2007).** Molecular and functional comparisons of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers originated from glycophytic and halophytic species. *J Zhejiang Univ SCIENCE B.* **9**: 132-140.

**Li L, Kim BG, Cheong YH, Pandey GK, Luan S (2006b)** A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K<sup>+</sup> channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 12625-12630.

**Li WY, Wong FL, Tsai SN, Phang TH, Shao G, Lam HM (2006a).** Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. *Plant Cell Environ.* **29**: 1122-1137.

**Li X, Borsics T, Harrington HM, Christopher DA (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.

**Liu H, Wang Q, Yu M, Zhang Y, Wu Y, Zhang H (2008)** Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively overexpressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage root. *Plant Cell Environ.* **31**: 1325-1334.

**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.* **21**: 1607-1619.

**Liu J, Zhu J-K (1997).** An *Arabidopsis* mutant with increased calcium requirement for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**: 14960–14964.

**Liu J, Zhu J-K (1998).** A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science.* **280**: 1943-1945.

**Liu JP, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu J-K (2000)** The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein-kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **97**: 3730-3734.

**Liu Y, Zheng Y, Zhang Y, Wang W, Li R (2010)** Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of *Escherichia coli* and stabilization of enzyme activity under diverse stresses. *Curr Microbiol.* **60**: 373-378.

**Logan BA (2005)** Reactive oxygen species and photosynthesis. In *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, ed. N Smirnoff, pp. 250–67. Oxford: Blackwell.

- Lu S-Y, Jing Y-X, Shen S-H, Zhao H-Y, Ma L-Q, Zhou X-J, Ren Q, Li Y-F (2005)** Antiporter gene from *Hordum brevisubulatum* (Trin.) link and its overexpression in transgenic tobaccos. *J Integr Plant Biol.* **47**:343–349.
- Luu D, Maurel C (2005)**. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ.* **28**: 85–96.
- Luan S (2009)** The CBL–CIPK network in plant calcium signalling. *Trends Plant Sci.* **14**: 37-42.
- Luan S, Lan W, Lee SC (2009)** Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL–CIPK network. *Curr Opin Plant Biol.* **12**: 339-346.
- Lunde C, Drew DP, Jacobs AK, Tester M (2007)** Exclusion of Na<sup>+</sup> via Sodium ATPase (PpENA1) Ensures Normal Growth of *Physcomitrella patens* under Moderate Salt Stress. *Plant Physiol.* **144**: 1786-1796.
- Maathuis F, Amtmann A (1999)** K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. *Ann Bot.* **84**: 123-133.
- Maathuis FJM (2006)** The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *J Exp Bot.* **57**: 1137-1147.
- Maathuis FJM (2009)** Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol.* **12**: 250-258.
- Maathuis FJM, Sanders D (2001)** Sodium uptake in *Arabidopsis thaliana* is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol.* **127**: 1617-1625.
- MacRobbie EAC (1998)** Signal transduction and ion channels in guard cells. *Phil Trans R Soc Lond B.* **353**: 1475-1488.
- Mahajan S, Pandey GK, Tuteja N (2008)** Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Arch Biochem Biophys.* **471**: 146-158.
- 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.
- Malagoli P, Britto DT, Schulze LM, Kronzucker HJ (2008)** Futile Na<sup>+</sup> cycling at the root plasma membrane in rice (*Oryza sativa* L.): kinetics, energetics, and relationship to salinity tolerance. *J Exp Bot.* **59**: 4109-4117.
- Maresova L, Sychrova H (2006)** *Arabidopsis thaliana* CHX17 gene complements the khal deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **23**: 1167-1171

**Marschner H (1995)** *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd edn. London, UK: Academic Press, 1-889.

**Martínez-Atienza J, Jiang X, Garcíadeblas B, Mendoza I, Zhu JK, Pardo JM, Quintero FJ (2007)** Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiol.* **143**: 1001-1012.

**Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F (2004)** Cloning and functional characterization of the high-affinity K<sup>+</sup> transporter HAK1 of pepper. *Plant Mol Biol.* **56**: 413-421.

**Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F (2005)** High-affinity K<sup>+</sup> uptake in pepper plants. *J Exp Bot.* **56**: 1553-1562.

**Martínez-Atienza J, Jiang X, Garcíadeblas B, Mendoza I, Zhu J-K, Pardo JM, Quintero FJ (2007)** Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiol.* **143**: 1001-1012.

**Mäser P, Eckelman B, Vaidyanathana R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, Yamagami M, Yamaguchi K, Nishimurae M, Uozumi N, Robertson W, Sussman MR, Schroeder JI (2002a)** Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1. *FEBS Letters* **531**: 157-161.

**Mäser P, Gierth M, Schroeder JI (2002b)** Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant Soil.* **247**: 43-54.

**Mäser 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.

**Maurel C, Chrispeels MJ (2001)** Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.* **125**: 135-138.

**Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008)** Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol.* **59**: 595-624.

**McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S (2000)** Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol.* **18**: 455-457.

**Mckersie BD, Bowley SR, Harjanto E, Leprince O (1996)** Water deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **111**: 1177-1181.

**Mennen H, Jacoby B, Marschner H (1990).** Is sodium proton antiport ubiquitous in plant? *J Plant Physiol.* **137**: 180-183.



- Mittler R, Blumwald E (2010)**. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**:443-462.
- Moller IS, Tester M (2007)** Salinity tolerance in Arabidopsis: a good model or cereals? *Trends Plant Sci.* **12**: 534-540.
- Møller IS, Gilliam M, Jha D, Mayo GM, Roy SJ, Coates JC, Haseloff J, Tester M (2009)** Shoot Na<sup>+</sup> exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na<sup>+</sup> transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **21**:2163-2178.
- Moore CA, Bowden HC, Scrase-Field S, Knight MR, White PJ (2002)** The deposition of suberin lamellae determines the magnitude of cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevations in root endodermal cells subjected to cooling. *Plant J.* **30**: 457-465.
- Moyle LC, Muir CD (2010)** Reciprocal insights into adaptation from agricultural and evolutionary studies in tomato. *Evolutionary Applications*; **3**: 409-421.
- Munns R (1993)** Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* **16**: 15-24.
- Munns R (2002)** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **25**: 239-250.
- Munns R (2005)** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* **167**: 645-663.
- Munns R, Greenway H, Kirst GO (1983)** Halotolerant eukaryotes. In O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H.H. Ziegler (Eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology New Series*, Vol. 12C, pp. 59-135. Berlin: Springer-Verlag.
- Munns R, Guo J, Passioura JB, Cramer GR (2000a)** Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Aust J Plant Physiol.* **27**: 949-957.
- Munns R, Hare RA, James RA, Rebetzke GJ (2000b)** Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Aust J Agr Res.* **51**: 69-74.
- Munns R, Husain S, Rivelli AR, James RA, Condon AG, Lindsay MP, Lagudah E, Schachtman D, Hare RA (2002)** Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant Soil.* **247**: 93-105.
- Munns R, James RA (2003)** Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant Soil.* **253**: 201-218.

**Munns R, Tester M (2008)** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **59**: 651-681.

**Muñoz-Mayor A, Pineda B, García-Abellán JO, García-Sogo B, Moyano E, Atares A, Vicente-Agulló F, Serrano R, Moreno V, Bolarin MC (2008)** The HAL1 function on Na<sup>+</sup> homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na<sup>+</sup> in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiol Plant.* **133**: 288-297.

**Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* **15**: 235-240.

**Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, (1999)** Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters.* **461**: 205-210.

**Nass R, Rao R (1999)** The yeast endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology.* **145**: 3221-3228.

**Navarro JM, Garrido C, Martínez V, Carvajal M (2003)** Water relations and xylem transport of nutrients in pepper plants grown under two different salt stress regimes. *Plant Growth Reg.* **41**: 237-245.

**Netting AG (2002)** pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions. II. Modifications in modes of metabolism induced by variation in the tension on the water column and by stress. *J Exp Bot.* **53**: 151-173.

**Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V, Rubio F (2010)** The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K<sup>+</sup> Transporter Is Required for Plant Growth and K<sup>+</sup> Acquisition from Low K<sup>+</sup> Solutions under Saline Conditions. *Mol Plant.* **3**: 326-333.

**Nieves-Cordones M, Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F (2007)** An NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-sensitive component dominates high-affinity K<sup>+</sup> uptake in tomato plants. *Plant Sci.* **172**: 273-280.

**Nieves-Cordones M, Miller AJ, Alemán F, Martínez V, Rubio F (2008)** A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Mol Biol.* **68**: 521-532.

**Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM y Pardo JM (1995)** Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* **109**: 735-742.

**Nuccio ML, Rhodes D, McNeil SD, Hanson AD (1999)** Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr Opin Plant Biol.* **2**: 128-134.

**Nuccio ML, Russell BL, Nolte KD, Rathinasabapathi B, Gage DA, Hanson AD (1998)** The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco  
230

expressing choline monooxygenase. *Plant J.* **16**: 487-496.

**Oh DH, Ali Z, Hyeong CP, Bressan RA, Dae JY, Bohnert HJ (2010)** Consequences of SOS1 deficiency: intracellular physiology and transcription. *Plant Signal Behav.* **5**: 766-768.

**Oh DH, Gong Q, Ulanov A, Zhang Q, Li Y, Ma W, Yun DJ, Bressan R.A & Bohnert HJ (2007b)** Sodium stress in the halophyte *Thellungiella halophylla* and transcriptional changes in a thsos1-RNA interference line. *J Integr Plant Biol.* **49**: 1484-1496.

**Oh DH, Leidi E, Zhang Q, Hwang S-M, Li Y, Quintero FJ, Jiang X, Paino D'Urzo M, Lee SY, Zhao Y, Bahk JD, Bressan RA, Yun D-J, Pardo JM, Bohnert HJ (2009)** Loss of halophytism by interference with SOS1 expression. *Plant Physiol.* **151**: 210-222.

**Oh SJ, Kwon CW, Choi DW, Song SI, Kim JK (2007a)** Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnol J.* **5**: 646-656.

**Ohnishi M, Fukada-Tanaka S, Hoshino A, Takada J, Inagaki Y, Iida S (2005)** Characterization of a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene InNHX2 and comparison of InNHX2 with InNHX1, which is responsible for blue flower coloration by increasing the vacuolar pH in Japanese Morning Glory. *Plant Cell Physiol.* **46**: 259-267.

**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 USA.* **100**: 11771-11776.

**Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, Hamada A, Tanaka A, Nakamura T, Hayakawa T. (2002)** Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Letters.* **532**: 279-282.

**Olías R, Eljakaoui Z, Li J, de Morales PA, Marín-Manzano MC, Pardo JM, Belver A. (2009a)** The plasma membrane Na(+)/H(+) antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na(+) between plant organs. *Plant Cell Environ.* **32**: 904-916.

**Olías R, Eljakaoui Z, Pardo JM, Belver A (2009b)** The Na(+)/H(+) exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na(+) in tomato plants under salinity conditions. *Plant Signal Behav.* **4**: 973-976.

**Olías R, Huertas R, Eljakaoui Z, Álvarez de Morales P, Jun L, Rodríguez-Rosales MP, Belver A (2008)** Characterization of a SOS2-like Protein Kinase Gene From Tomato (*Solanum lycopersicum*) and its Role in Salt Tolerance. In Presente y Futuro de la Nutrición Mineral de las Plantas Editores: L. Romero, JM Ruiz, B Blasco, M Rubio, E Sánchez, J J Ríos, L M Cervilla (Editores) pp. 383-392, ISBN 978-84-89780-10-7.

**Olías R, Li J, Alvarez de Morales P, Eljakaoui Z, Morales S, de Dios Alché J, Benito B, Belver A (2009)** Functional characterization of SINhaD1, a cation/H<sup>+</sup> antiporter from

tomato, and its implication in salt tolerance. *Plant Abiotic Stress Tolerance*. Vienna, Austria 8-11 February .

**Orsini F, Cascone P, De Pascale S, Barbieri G, Corrado G, Rao R, Maggio A (2009)** Systemin-dependent salinity tolerance in tomato: evidence of specific convergence of abiotic and biotic stress responses. *Physiol plantarum* **138**: 10-21.

**Ottow EA, Polle A, Brosché M, Kangasjärvi J, Dibrov P, Zörb C, Teichmann T (2005)** Molecular characterization of PeNHaD1: the first member of the NhaD Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter family of plant origin. *Plant Mol Biol*. **58**:75-88.

**Padmanaban S, Charoi S, Kwak JM, Li X, Ward JM, Sze H (2007)**. Participation of endomembrane cation/H<sup>+</sup> exchanger AtCHX20 in osmoregulation of guard cells. *Plant Physiol*. **144**: 82-93

**Pandey GK, Reddy VS, Reddy MK, Deswal R, Bhattacharya A, Sopory SK (2002)** Transgenic tobacco expressing *Entamoeba histolytica* calcium binding protein exhibits enhanced growth and tolerance to salt stress. *Plant Sci*. **162**:4147.

**Pardo JM (2010)** Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr Opin Biotechnol*. **21**: 185-196.

**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.

**Parks GE, Dietrich MA, Schumaker KS (2002)** Increased vacuolar Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *J Exp Bot*. **53**: 1055-1065.

**Pasapula V, Shen G, Kuppu S, Paez-Valencia J, Mendoza M, Hou P, Chen J, Qiu X, Zhu L, Zhang X, Auld D, Blumwald E, Zhang H, Gaxiola R, Payton P (2011)** Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnol J*. **9**: 88-99.

**Passioura JB, Munns R (2000)** Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Aust. J. Plant Physiol*. **27**: 941-948.

**Paul MJ, Foyer CH (2001)** Sink regulation of photosynthesis. *J. Exp. Bot*. **52**: 1383-1400.

**Pérez-Alfocea F, Estañ MT, Cano M, Bolarin MC (1993)** Reponse of tomato cultures to salinity. *Plant Soil*. **25**: 203-211.

**Perl A, Perl-Treves R, Galili S, Aviv D, Shalgi E, Malkin. S, Galun E (1993)** Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases. *Theor Appl Genet*. **85**: 568-576.

- Pessarakli M, Szabolcs I (1994)**. Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. En M. Pessarakli (Eds.), *Handbook of Plant and Crop Stress*. pp. 1-15 New York: Marcel Dekker
- Peters JS, Berkowitz GA (1991)** Studies on the system regulating proton movement across the chloroplast envelope. Effects of ATPase inhibitors,  $Mg^{2+}$ , and an amine anesthetic on stromal pH and photosynthesis. *Plant Physiol.* **95**: 1229-1236.
- Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin H-X, Luan S, Maser P, Pantoja O, Rodríguez-Navarro A, Schachtman A-A, Schroeder JI, Sentenac H, Uozumi N, nor Very A-A, Zhu J-K, Dennis ES, Tester M (2006)** Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* **11**: 372-374.
- Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken JW, Smeekens SCM (1995)** Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* **107**: 125-130.
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S, Van Dun K, Voogd E, Verwoerd TC, Krutwagen RWHH, Giddijn JM (1998)** Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J Plant Physiol.* **152**: 525-532.
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, van Dun K (1999)** Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiol Biochem.* **37**: 313-317.
- Pisinaras V, Tsihrintzis VA, Petalas K, Ouzounis K (2010)** Soil salinization in the agricultural lands of Rhodope District, northeastern Greece. *Environ Monit Assess.* **166**: 79-94.
- Poljakoff-Mayber A (1975)** Morphological and anatomical changes in plants as a response to salinity. In: Poljakoff-Mayber A, Gale J, eds. *Plants in saline environments*. Berlin: Springer-Verlag, 97-117.
- Pollard A, Wyn Jones WG (1979)** Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta.* **144**: 291-298.
- Porat R, Pavoncello D, Ben-Hayyim G, Lurie S (2002)** A heat treatment induced the expression of a  $Na^+/H^+$  antiport gene (cNHX1) in citrus fruit. *Plant Sci.* **162**: 957-963.
- Prasad KVSK, Sharmila P, Kumar PA, Saradhi PP (2000)** Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial codA gene enhances its tolerance to salt stress. *Mol Breed.* **6**: 489-499.

**Qi Z, Spalding EP (2004)** Protection of plasma membrane K<sup>+</sup> transport by the Salt Overly Sensitive1 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiporter during salinity stress. *Plant Physiol.* **136**: 2548-2555.

**Qiu QS, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Zhu JK, Schumaker KS (2003)** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**: 1041-1052.

**Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu J-K (2002)** Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 8436-8441.

**Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK (2004)** Regulation of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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.

**Queirós F, Fontes N, Silva P, Almeida D, Maeshima M, Gerós H, Fidalgo F (2009)** Activity of tonoplast proton pumps and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in potato cell cultures is modulated by salt. *J Exp Bot.* **60**: 1363-1374.

**Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM (2000)** Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Letters.* **471**: 224-228.

**Quintero FJ, Ohta M, Shi HZ, Zhu J-K, Pardo JM (2002)** Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proc Nat. Acad Sci USA.* **99**: 9061-9066.

**Rajagopal D, Agarwal P, Tyagi W, Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK (2007)** *Pennisetum glaucum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers high level of salinity tolerance in transgenic *Brassica juncea*. *Mol Breeding.* **19**: 137-151.

**Rathinasabapathi B (2000)** Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Ann. Bot.* **86**: 709-716.

**Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX (2005)** A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet.* **37**: 1141-1146.

**Reyes J, Rodrigo M-J, Colmenero-Flores J, Gil J-V, Garay- Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias A (2005)** Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant Cell Environ.* **28**: 709-718.

**Rhodes D, Hanson AD (1993)** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **44**: 357-384.

**Rhodes D, Nadolska-Orczyk A, Rich PJ (2002)** Salinity, osmolytes and compatible solutes. In: Läuchli A, Lüttge U, eds. Salinity: environment–plant–molecules. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer, 181–204.

**Roberts CS, Rajagopal S, Smith L, Nghyen T, Yang W, Nugroho S, Ravi RS, Cao ML, Chandra KV, Pattell V, Hadcourt R, Dransfield L, Desamero N, Slamst I, Keese P, Killian A, Jeffrerson RA (1997)**. A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulation and efficient transformation of plants. *Rockefeller Found. Meet. Intern. Program on Rice Biotechnology*. 15-19 Sept. Malacca, Malaysia.

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

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

**Rodríguez-Rosales MP, Jiang XJ, Gálvez FJ, Aranda MN, Cubero B, Venema K (2008)** Overexpression of the tomato K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytol.* **179**: 366-377.

**Rodríguez-Rosales MP, Gálvez FJ, Huertas R, Aranda MN, Baghour M, Cagnac O, Venema K (2009)** Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal Behav.* **4**: 265-276. Review.

**Romero-Aranda MR, Jurado O, Cuartero J (2006)** Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. *J Plant Physiol.* **163**: 847-855

**Roos W (2000)** Ion mapping in plant cells – methods and applications in signal transduction research. *Planta.* **210**: 347-370.

**Rorat T (2006)** Plant dehydrins-tissue location, structure and function. *Cell Mol Biol Lett.* **11**: 536-556.

**Roxas VP, Smith RKJr, Allen ER, Allen RD (1997)** Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat Biotechnol* **15**: 988-991.

**Roy M, Wu R (2001)** Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Sci.* **160**: 869-875.

**Roy M, Wu R (2002)** Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice

increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Sci.* **163**: 987-992.

**Roy SJ, Gilliam M, Berger B, Essah PA, Cheffings C, Miller AJ, Davenport RJ, Liu LH, Skynner MJ, Davies JM, Richardson P, Leigh RA, Tester M (2008)** Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **31**: 861-871.

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

**Rubio F, Alemán F, Nieves-Cordones M, Martínez V (2010)** Studies on *Arabidopsis athak5, atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K uptake. *Physiol plantarum.* **139**: 220-228.

**Rubio F, Santa-María GE, Rodríguez-Navarro A (2000)** Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol Plant.* **109**: 34-43.

**Rus A, Baxter I, Muthukumar B, Gustin J, Lahner B, Yakubova E, Salt DE (2006)** Natural variants of AtHKT1 enhance Na<sup>+</sup> accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **2**: 1964-1973.

**Rus AM, Bressan RA, Hasegawa PM (2005)** Unraveling salt tolerance in crops. *Nat Gen.* **37**: 1029-1030.

**Rus A, Lee B, Muñoz-Mayor A, Sharkuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM (2004)** AtHKT1 facilitates Na<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> nutrition in plants. *Plant Physiol.* **136**: 2500-2511.

**Rus, A, Yokoi S, Atanbradralt S, Reddy M, Lee B, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM (2001)** AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 14150-14155.

**Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B, Vidal S (2006)** A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J.* **45**: 237-249.

**Saier MH Jr (1999)** A functional.phylogenetic system for the classification of transport proteins. *J Cell Biochem.* **32-33**: 84-94. Review.

**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.



- Sakano K (1998)** Revision of biochemical pH-Stat: Involvement of alternative pathway metabolisms. *Plant Cell Physiol.* **39**: 467-473.
- Sakamoto A, Murata A, Murata N (1998)** Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol Biol.* **38**:1011-1019.
- 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 J-K, Albert A (2005)** The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *J Mol Biol.* **345**: 1253-1264.
- Sánchez-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.
- Santa-Maria GE, Rubio F, Dubcovsky J, Rodríguez-Navarro A (1997)** The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell*; **9**:2281-2289.
- Sawahel WA, Hassan AH (2002)** Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotech Lett.* **24**:721-725.
- Schachtman DP, Kumar R, Schroeder JI, Marsh EL (1997)** Molecular and functional characterization of a novel lowaffinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 11079-11084.
- Senadheera P, Singh RK, Maathuis FJM (2009)** Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. *J Exp Bot.* **60**: 2553-2563
- Sen Gupta A, Heinen JL, Holady AS, Burke JJ, Allen RD (1993)** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that over-express chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Nat Acad Sci USA.* **90**:1629-1633.
- Seong ES, Cho HS, Choi D, Joung YH, Lim CK, Hur JH, Wang M-H (2007)** Tomato plants overexpressing CaKR1 enhanced tolerance to salt and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* **363**: 983-988.
- 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.

**Shabala S (2000)** Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. *Plant Cell Environ.* **23**:825-838.

**Shabala L, Cuin TA, Newman IA, Shabala S (2005)** Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis* sos mutants. *Planta.* **222**:1041-1050.

**Shabala S, Cuin TA (2007)** Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum.* **133**: 651-669.

**Shahin EA (1985)** Totipotency of tomato protoplasts. *Theor Appl Gen.* **69**: 235-240.

**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.

**Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997)** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.* **113**:1177–1183.

**Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu J-K (2000)** The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc Nat Acad Sci USA.* **97**: 6896-6901.

**Shi H, Lee B-H, Wu S-J, Zhu, JK (2003)** Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotech.* **21**: 81-85.

**Shi H, Zhu JK (2002)** Regulation of expression of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol.* **50**: 543-550.

**Shi HZ, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu J-K (2002)** The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *Plant Cell.* **14**: 465–77

**Shi LY, Li HQ, Pan XP, Wu GJ, Li MR (2008)** Improvement of *Torenia fournieri* salinity tolerance by expression of *Arabidopsis* AtNHX5. *Functional Plant Biol.* **35**: 185-192.

**Shoji T, Suzuki K, Abe T, Kaneko Y, Shi H, Zhu JK, Rus A, Hasegawa PM, Hashimoto T (2006)** Salt stress affects cortical microtubule organization and helical growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **47**: 1158–1168.

**Silberbush M, Ben-Asher J (2001)** Simulation study of nutrient uptake by plants from soilless cultures as affected by salinity buildup and transpiration. *Plant and Soil.* **233**: 59–69

- Song C, Guo Y, Qiu Q, Lambert G, Galbraith DW, Jagendorf A, Zhu JK (2004)** A probable Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat Acad Sci USA*. **101**:10211–10216
- Sottosanto JB, Gelli A, Blumwald E (2004)** DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J*. **40**: 752-771.
- Staal M, Maathuis FJM, Elzenga JTM, Overbeek JHM, Prins HBA (1991)** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol Plant*. **82**:179-184.
- Stelzer R, Läuchli A (1977)** Salt- and flooding tolerance of *Puccinellia peisonis*. I The effect of NaCl- and KCl-salinity on growth at varied oxygen supply to the root. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*. **83**: 35–42.
- Stokstad E (2010)** Biotech Crops Good for Farmers and Environment, Academy Finds. *Science*. 328: 295.
- Su J, Wu R (2004)** Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Sci*. **166**: 941–948.
- Su H, Golldack D, Zhao CS, Bohnert HJ (2002)** The expression of HAK-type K<sup>+</sup> transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiol*. **129**: 1482–1493
- Sun S-J, Guo S-Q, Yang X, Bao Y-M, Tang H-J, Sun H, Huang J, Zhang H-S (2010a)** Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice. *Journal of experimental botany*. 61:2807-2818.
- Sun W, Xu X, Zhu H, Liu A, Liu L, Li J, Hua X (2010b)** Comparative transcriptomic profiling of a salt-tolerant wild tomato species and a salt-sensitive tomato cultivar. *Plant and Cell Physiology*. **51**: 997-1006.
- Sunarpi, Horie T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, Horie R, Chan WY, Leung HY, Hattori K, Konomi M, Osumi M, Yamagami M, Schroeder JI, Uozumi N (2005)** Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter induced Na unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J*. **44**: 928–938.
- Szabolcs I (1989)** Salt-affected soils, Boca Raton: CRC Press.
- Sze H, Padmanaban S, Cellier F, Honys D, Cheng NH, Bock KW, Conejero G, Li X, Twell D, Ward JM, Hirschi KD (2004)** Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K<sup>+</sup> homeostasis in pollen development. *Plant Physiol*. **136**: 2532-47.

**Sze H, Li X., Palmgren MG (1999)** Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup> 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.

**Tang R-J, Liu H, Bao Y, Lv Q-D, Yang L, Zhang H-X (2010)** The woody plant poplar has a functionally conserved salt overly sensitive pathway in response to salinity stress. *Plant Mol Biol*. **74**: 367-380.

**Talke IN, Blaudez D, Maathuis FJM, Sanders D (2003)** CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signaling? *Trends Plant Sci*. **8**: 286–293.

**Tapken D, Hollmann M (2008)** Arabidopsis thaliana glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *J Mol Biol*. **383**: 36-48.

**Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1993)** Stress protection of transgenic tobacco by production of osmolyte mannitol. *Science*. **259**:508–510.

**Termaat A, Passioura JB, Munns R (1985)** Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl-affected wheat and barley. *Plant Physiol*. **77**: 869–872.

**Tester M, Bacic A (2005)** Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiol*. **137**: 791-793.

**Tester M, Davenport R (2003)** Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann. Bot*. **91**: 503-527.

**Thackray PD, Behravan J, Southworth TW, Moir A (2001)** GerN, an antiporter homologue important in germination of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*. **183**: 476-482.

**Thomas JC, Sepahi M, Arendall B, Bohnert HJ (1995)** Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Environ*. **18**:801–806.

**Tian L, Huang C, Yu R, Liang R, Li Z, Zhang L, Wang Y, Zhang X, Wu Z (2006)** Overexpression AtNHX1 confers salt-tolerance of transgenic tall fescue. *Afr J Biotechnol*. **5**:1041–2044.

**Tóth G, Adhikari K, Várallyay Gy, Tóth T, Bódis K, Stolbovoj V (2008)** Updated map of salt affected soils in the European Union. In: Threats to Soil Quality in Europe. Eds: Tóth, G., Montanarella, L., Rusco, E. 65–77. EC Joint Res. Centre, Institute for Environment and Sustainability. Ispra.

- Towbin H Staehelin T Gordon J (1979)** Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. **76**: 4350-4354.
- Tracy FE, Gilliam M, Dodd AN, Webb AAR, Tester M (2008)** Cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environl*. **31**:1063-1073.
- Trejo CL, Davies WJ, Ruiz L (1993)** Sensitivity of stomata to Abscisic Acid (An effect of the mesophyll). *Plant Physiol*. **102**:497-502.
- Tuteja N (2008)** Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Meths in Enzymol*. **428**: 419-438
- Uddin MI Qi Y Yamada S Shibuya I Deng XP Kwak SS Kaminaka H Tanaka K (2008)** Overexpression of a new rice vacuolar antiporter regulating protein OsARP improves salt tolerance in tobacco. *Plant Cell Physiol*. **49**: 880-890.
- Ungar IA (1991)** Ecophysiology of Vascular Halophytes. Boca Raton: CRC Press.
- 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  $\text{Na}^+$  currents in *Xenopus laevis* oocytes and  $\text{Na}^+$  uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physio*. **122**: 1249-1259.
- Van Camp W, Capiou K, Van Motagu M, Inze D, Slooten L (1996)** Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol*. **112**:1703–1714.
- Vasekina AV, Yershov PV, Reshetova OS, Tikhonova TV, Lunin VG, Trofimova MS, Babakov AV (2005)** Vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from Barley: identification and response to salt stress. *Biochemistry (Mosc)*. **70**: 100-107.
- Venema K, Belver A, Marín-Manzano MC, Rodríguez-Rosales MP, Donaire JP (2003)** A novel intracellular  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter related to  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters is important for  $\text{K}^+$  ion homeostasis in plants. *J Biol Chem*. **278**: 22453-22459.
- Venema K, Quintero FJ, Pardo JM, Donaire JP (2002)** The *Arabidopsis*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem*. **277**: 2413-2418.
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ, Pantoja O (2004)** Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol*. **135**: 2318-2329.

**Vera-Estrella R, Barkla BJ, García-Ramírez L, Pantoja O (2005)** Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na<sup>+</sup> transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol.* **139**: 1507-1517.

**Verma D, Singla-Pareek SL, Rajagopal D, Reddy MK, Soory SK (2007)** Functional validation of a novel isoform of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Pennisetum glaucum* for enhancing salinity tolerance in rice. *J Biosci.* **32**: 621-628.

**Verslues PE, Batelli G, Grillo S, Agius F, Kim YS, Zhu J, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J-K (2007)** Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol.* **27**: 7771-7780.

**Viehweger K, Dordschbal B, Roos W (2002)** Elicitor-activated phospholipase A<sub>2</sub> generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H<sup>+</sup> pool for pH signalling via the activation of Na<sup>+</sup>-dependent proton fluxes. *Plant Cell.* **14**: 1509-1525.

**Villalta I, Reina-Sanchez A, Bolarin MC, Cuartero J, Belver A, Venema K, Carbonell EA, Asins MJ (2008)** Genetic analysis of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations in leaf and stem as physiological components of salt tolerance in tomato. *Theoretical and applied genetics.* **116**: 869-880.

**Vinocur B, Altman A (2005)** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotech.* **16**: 123-132.

**Waie B Rajam MV (2003)** Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Sci.* **164**:727-734.

**Waisel Y (1972)** *Biology of Halophytes*. Academic Press, New York and London.

**Walker DJ, Leigh RA, Miller AJ (1996)** Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **93**: 10510-10514.

**Wang J, Zuo K, Wu W, Song J, Sun X, Lin J, Li X, Tang K (2004)** Expression of a novel antiporter gene from *Brassica napus* resulted in enhanced salt tolerance in transgenic tobacco plants. *Biol Plant.* **48**: 509-515.

**Wang M, Gu D, Liu T, Wang Z, Guo X, Hou W, Bai Y, Chen X, Wang G (2007)** Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance. *Plant Mol Biol.* **65**:733-746.

**Wild A (1988)** *Russell's soil conditions and plant growth*. 11th edn. Harlow: Longman.

**Wilson C, Shannon MC (1995)** Salt-induced Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic species of tomato. *Plant Sci.* **107**: 147-157.

- Winicov I (1998)** New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Ann. Bot.* **82**: 703-710.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007)** An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*. **8**: e718
- Wu SJ, Ding L, Zhu JK (1996)** SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell*. **8**: 617-627.
- Wu CA, Yang GD, Meng QW, Zheng CC (2004)** The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol*. **45**: 600-607.
- 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.
- Wyn Jones RG, Pollard A (1983)** Proteins, enzymes and inorganic ions, in: A. Lauchli, A. Person (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 15B, Springer, NewYork, pp. 528-562.
- Xia T, Apse MP, Aharon GS, Blumwald E (2002)** Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiol Plant*. **116**: 206-212.
- Xiao-Yan Y, Ai-Fang Y, Ke-Wei Z, Ju-Ren Z (2004)** Production and analysis of transgenic maize with improved salt tolerance by the introduction of AtNHX1 gene. *Acta Bot Sin*. **46**: 854-61.
- Xiong L, Zhu J-K (2002)** Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ*. **25**: 131-139.
- Xiong L, Zhu JK (2001)** Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant*. **112**:152-166.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T-HD, Wu R (1996)** Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*. **110**: 249–257.
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH (2006)** A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*. **125**: 1347-1360.

**Xu DQ, Huang J, Guo SQ, Yang X, Bao YM, Tang HJ, Zhang HS (2008a)** Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Lett.* **582**:1037–1043.

**Xu WF, Shi WM, Ueda A, Takabe T (2008b)** Mechanisms of salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* carrying a peroxisomal ascorbate peroxidase gene from Barley. *Pedosphere.* **18**: 486–495.

**Xu J, Tian Y-S, Peng R-H, Xiong A-S, Zhu B, Jin X-F, Gao F, Fu X-Y, Hou X-L, Yao Q-H (2010)** AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. *Planta.* **231**: 1251-1260.

**Xue ZY, Zhi DY, Xue GP, Zhang H, Zhao YX, Xia GM (2004)** Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Sci.* **167**:849–859.

**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 and Environment.* **19**: 329–336.

**Yamaguchi T, Apse MP, Shi H, Blumwald E (2003)** Topological analysis of a plant vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**: 12510-12515.

**Yamaguchi T, Aharon GS, Sottosanto JB, Blumwald E (2005)** Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca<sup>2+</sup>- and pH- dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**: 16107-16112.

**Yamaguchi T, Blumwald E (2005)** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *T Plant Sci.* **10**: 615-620.

**Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982)** Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science.* **217**: 1214-1222.

**Yang G, Rhodes D, Joly RJ (1996)** Effects of high temperature on membrane stability and chlorophyll fluorescence in glycine betaine-deficient and glycine betaine containing maize lines. *Aust J Plant Physiol.* **23**:437–443.

**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. *Molecular Plant.* **2**: 22–31.

**Yang L, Ji W, Zhu Y, Gao P, Li Y, Cai H, Bai X, Guo D (2010)** GsCBRLK, a calcium/calmodulin-binding receptor-like kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt and ABA stress. *Journal of Experimental Botany,* **61**: 2519–2533.



- Yao X, Horie T, Xue S, Leung H-Y, Katsuhara M, Brodsky DE, Wu Y, Schroeder JI (2010)** Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 transporters in plant cells. *Plant Physiol.* **152**: 341-355.
- Yeo A (2007)** Salinity. In *Plant Solute Transport*. AY Yeo and TJ Flowers eds. Pp 340-370. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Yeo AR (1998)** Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* **49**: 915-929.
- Yeo AR, Flowers SA, Rao G, Welfare K, Senanayake N, Flowers TJ (1999)** Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow. *Plant, Cell and Environment.* **22**: 559-565.
- Yeo AR, Lee KS, Izard P, Boursier PJ, Flowers TJ (1991)** Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* **42**: 881-889.
- Yokoi S, Bressan RA, Hasegawa PM (2002a)** Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report*, 25-33.
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (2002b)** Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant J.* **30**: 529-539.
- Yoshida K, Kawachi M, Mori M, Maeshima M, Kondo M, Nishimura M, Kondo T (2005)** The involvement of tonoplast proton pumps and Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchangers in the change of petal colour during flower opening of Morning Glory, *Ipomea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Plant Cell Physiol.* **46**: 407-415.
- Zahran HH, Marín-Manzano MC, Sánchez-Raya AJ, Bedmar EJ, Venema K, Rodríguez-Rosales MP (2007)** Effect of salt stress on the expression of NHX-type ion transporters in *Medicago intretecta* and *Melilotus indicus* plants. *Physiol Plant.* **131**: 122-130.
- Zhang GH, Su Q, An LJ, Wu S (2008)** Characterization and expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus litoralis*. *Plant Physiol Biochem.* **46**: 117-126.
- 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.

**Zhao HW, Chen YJ, Hu YL, Gao Y, Lin ZP (2000)** Construction of a trehalose-6-phosphate synthase gene driven by drought responsive promoter and expression of drought-resistance in transgenic tobacco. *Acta Bot Sinica*. **42**: 616-619.

**Zhao J, Zhi D, Xue Z, Liu H, Xia G (2007)** Enhanced salt tolerance of transgenic progeny of tall fescue (*Festuca arundinacea*) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*. **164**: 1377-1383.

**Zhao F, Guo S, Zhang H, Zhao Y (2006)** Expression of yeast SOD2 in transgenic rice results in increased salt tolerance. *Plant Sci*. **170**: 216-24.

**Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005)** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. **23**: 283-333.

**Zhao J, Cheng NH, Motes CM, Blancaflor EB, Moore M, Gonzales N, Padmanaban S, Sze H, Ward JM, Hirschi KD (2008)** AtCHX13 is a plasma membrane K<sup>+</sup> transporter. *Plant Physiol*. **148**: 796-807.

**Zhu J-K (2000)** Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **124**: 941-948.

**Zhu J-K (2001)** Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sciences*. **6**: 66-71.

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

**Zhu YL, Pilon-Smits E, Jouanin L, Terry N (1999)** Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol*. **119**: 73-79.

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

**Zhu B, Su J, Chang M, Verma DPS, Fan YL, Wu R (1998b)** Overexpression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci*. **199**: 41-48.

**Zörb C, Noll A, Karl S, Leib K, Yan F, Schubert S (2004)** Molecular characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays L.*) and their expression under salt stress. *J Plant Physiol*. **162**: 55-66.

- Zhao, J. Zhi, D. Xue, Z. Liu, H. Xia, G.** (2007). Enhanced salt tolerance of transgenic progeny of tall fescue (*Festuca arundinacea*) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from Arabidopsis. *J Plant Physiol*; **164**: 1377-1383.
- Zhao, F. Guo, S. Zhang, H. Zhao, Y.** (2006). Expression of yeast SOD2 in transgenic rice results in increased salt tolerance. *Plant Sci*; **170**:216–24.
- Zhao, J. Davis, L.C. Verpoorte, R.** (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*; **23**: 283-333.
- Zhao J, Cheng NH, Motes CM, Blancaflor EB, Moore M, Gonzales N, Padmanaban S, Sze H, Ward JM, Hirschi KD.** (2008). AtCHX13 is a plasma membrane K<sup>+</sup> transporter. *Plant Physiol*; **148**: 796-807.
- Zhao, Y. Wang, T. Zhang, W. Li, W.** (2010). SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in Arabidopsis. *New Phytol*.
- Zhu, J-K.** (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. *Plant Physiol*. **124**: 941-948.
- Zhu J-K.** (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sciences*. **6**: 66–71.
- Zhu J-K.** (2002). Salt and drought signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. **53**: 247–73
- Zhu, YL. Pilon-Smits, E. Jouanin, L. Terry, N.** (1999). Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol* **119**:73–79.
- Zhu J-K, Liu J y Xiong L.** (1998a) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* **10**: 1181-1191.
- Zhu, B. Su, J. Chang, M. Verma, D.P.S. Fan, Y.L. Wu, R.** (1998b). Overexpression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci* **199**:41–48
- Zörb C, Noll A, Karl S, Leib K, Yan F, Schubert S.** (2004). Molecular characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays L.*) and their expression under salt stress. *J Plant Physiol* ; **162**: 55-66.