



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN
CSIC, GRANADA**

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

**Caracterización de la familia de antiportadores
LeNHX de tomate**

**Tesis Doctoral
Francisco Javier Gálvez Segovia
Granada, 2009**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco Javier Gálvez Segovia
D.L.: GR 3480-2009
ISBN: 978-84-692-5859-0

UNIVERSIDAD DE GRANADA
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN
CSIC, GRANADA

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

Caracterización de la familia de antiportadores
LeNHX de tomate

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el licenciado en Bioquímica,
Francisco Javier Gálvez Segovia para aspirar al grado de Doctor

Fdo Francisco Javier Gálvez Segovia

V^oB^o Directores de la Tesis

Fdo. María Pilar Rodríguez Rosales
Doctora en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC

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

GRANADA 2009

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

Este trabajo ha sido cofinanciado por dicho grupo y los proyectos del Plan Nacional (BIO2005-00878) “Transportadores iónicos implicados en la adaptación de las plantas al estrés salino: caracterización funcional” y (BIO 2008-01691) “Análisis funcional de antiportadores Cation/Protón de plantas”

Tras años y años dándole vueltas a los NHX son muchas a las personas a las que tengo que agradecer su ayuda, sus ideas y consejos o su apoyo, todos y cada uno de vosotros habéis contribuido con vuestro granito de arena, o con un cubo lleno a que este trabajo salga “ pa`lante”. Gracias por echarme una mano, sin vosotros no hubiera sido posible.

En primer lugar agradecer al Dr Kees Venema y la Dra Pilar Rodríguez Rosales por permitirme poder llevar a cabo la tesis bajo su dirección, por marcar el camino a seguir, por su paciencia, por su buen humor, por su generosidad, y por todo lo que me ha enseñado. También a Don Juan Pedro Donaire que aunque por un breve periodo de tiempo, también ejerció de director prestándome su ayuda y sus consejos.

A Mamen Marín, pocos habrán tenido la suerte de tener una maestra como ella.

A Andrés Belver y a Raquel Olías por sus valiosas observaciones y consejos.

A Olivier Cagnac, Mourad Baghour, Zakia El Jakaoui, y muy especialmente a Raúl Huertas y a Nieves Aranda por sus consejos, por dar otros puntos de vista y porque las penas con compañeros así, son menos.

A Ana Vílchez, Isabel Gaspar y a Conchi, por su inestimable ayuda técnica.

A la buena gente del IRNAS en Sevilla, gracias por acogerme como un miembro más de esa gran familia que formáis, a José Manuel Pardo por darme la oportunidad de aprender un montón de cosas, y muy especialmente a

Beatriz Cubero, gran investigadora, gran maestra y gran persona, por acogerme bajo su tutela como si fuera uno más de sus becarios, en realidad le estoy doblemente agradecido ya que la localización del LeNHX2 es obra suya.

A Ana Domínguez, Mari Carmen Hernández Soriano, Quina Nogales, María Rodríguez, Jose Carlos Jimenez, Juan de Dios Barajas, Paz Álvarez de Moral y Morad Airaki, por saber de lo suyo, y saber mucho, y en algun momento haberlo compartido conmigo.

Hay otros amigos que no saben de Biología Molecular, sino de cosas más mundanas, pero que tienen que tener su lugar en estos agradecimientos, Migue Fernandez, Luis Salto, Rafa Delgado, Paco Bonachela, David Malagón, María Jesús Valenzuela, Sheila Vicente, José Antonio Dueñas y la “Panto”.

A mis padres, por forjarme con esos principios tan buenos, y por estar ahí, siempre al pie del cañón. Por creer en mí y darme todo lo que han podido y más, por su amor incondicional.

A mis padres

...

“La ciencia se compone de errores
que a su vez son los pasos hacia la verdad”

Julio Verne

“Un buen trago de whisky al acostarse,
no es muy científico, pero ayuda”

Sir Alexander Flemming

Índice de figuras y tablas

Antecedentes científicos

Figuras

Fig. A1. Variación en el peso seco de la parte aérea de distintas especies de plantas.....	pag 25
Fig A2. Efecto del estrés salino sobre la tasa de crecimiento de las plantas.....	pag 31
Fig A3. Movimiento de Na ⁺ en la planta.....	pag 43
Fig A4. Control de la homeostasis iónica por proteínas de la ruta SOS.....	pag 55
Fig A5. Implicación del complejo SOS3-SOS2 en la homeostasis del Na ⁺ y la tolerancia a la salinidad.....	pag 58
Fig A6. Árbol filogenético de las 79 proteínas antiportadoras protón/catión monovalente de la familia CPA1.....	pag 66
Fig A7. Modelo de la topología de AtNHX1.....	pag 79
Fig A8. Modelo de la estructura de AtNHX1.....	pag 80

Tablas

Tabla A1. Distribución regional de suelos afectados por la salinidad.....	pag 23
Tabla A2. Números de accesión y longitud de las proteínas mostradas en la figura A6.....	pag 65

Materiales y Métodos

Figuras

Fig.M1 Transformación de cotiledones de tomate.....	pag 116
Fig M2. Regeneración de tallos a partir de cotiledones transformados.....	pag 117
Fig. M3. Inducción de raíces <i>in Vitro</i> en medio RM-K.....	pag 117
Fig M4. Cultivo en maceta con turba de una planta de tomate regenerada a partir de cotiledones transformados.....	pag 117
Fig. M5. Clonaje utilizando la tecnología <i>Gateway</i>	pag 127
Fig. M6. Vector pENTR TM /D-TOPO [®]	pag 129
Fig M7. Esquema de PCR interna o anidada.....	pag 137
Fig. M8. Esquema de la reacción 3'RACE.....	pag 139
Fig. M9. Esquema de la reacción 5'RACE.....	pag 140
Fig. M10. Mapa del vector pYES-DEST52.....	pag 142
Fig M11. Eliminación del sitio NcoI de la posición 1346 de LeNHX2.....	
Fig M12. Plásmido pKV93 con la construcción para la sobreexpresión de LeNHX2.....	pag 147
Fig M13. Vector pKANNIBAL.....	pag 148
Fig M14. Construcción <i>hairpinRNAi</i> en el plásmido Pkannibal.....	pag 149
Fig M15. Vector pART27.....	pag 150
Fig M16. Vector p2GWF7,0.....	pag 152

Fig M17. Vector p2FGW7,0.....pag 153.

Fig M18. Relación entre la fluorescencia de la piranina (0,25 μ M)
en BTP-MES (20 mM), glicerol (10%) y el pH.....pag 167

Fig M19. Espectro de excitación de piranina (emisión 511 nm)
encapsulado en proteoliposomas.....pag 169.

Fig M20. Esquema de la metodología seguida para la obtención de
membranas microsomales de raíz y parte aérea
de Arabidopsis.....pag 176

Tablas

Tabla M1. Características de las cepas de
E. coli utilizadaspag 99

Tabla M2. Características de las cepas de
A. tumefaciens utilizadaspag 100

Tabla M3. Medios utilizados para el cultivo de bacterias.....pag101

Tabla M4. Características de las cepas de
levaduras utilizadaspag 104

Tabla M5. Medios de cultivo de levaduras.....pag 106

Tabla M6. Soluciones nutritivas utilizadas
para el cultivo de tomate.....pag 112

Tabla M7. Composición de los medios de cultivo usados en los
experimentos de transformación de tomate.....pag....118

Tabla M8. Protocolo general de PCR.....pag 123

Tabla M9. Cebadores usados en la clonación de
LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4 en pENTR/D-TOPO.....pag 129

Tabla M10. Listado de construcciones utilizadas.....	pag 144
Tabla M11. Cebadores utilizados para el análisis por PCR de la expresión de LeNHX1, 2, 3 y 4 en distintos tejidos de plantas de tomate.	pag 155
Tabla M12. Cebadores utilizados en los ensayos de PCR a tiempo real para cuantificar los niveles de expresión de los genes LeNHX en especies de tomate tolerante y sensible a la salinidad.....	pag 156
Tabla M13. Soluciones utilizadas para la purificación de proteínas LeNHX por cromatografía de afinidad.....	pag 160
Tabla M14. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR a tiempo real para cuantificar el nivel de silenciamiento del LeNHX2.....	pag 182

Resultados

Figuras

Fig. R1. Alineamiento de las secuencias de los antiportadores NHX de Arabidopsis y tomate.....	pag 192
Fig R2. Árbol filogenético de los antiportadores NHX de Arabidopsis y tomate.	pag 194
Fig. R3. Expresión de antiportadores NHXs de tomate en distintos tejidos.....	pag 196
Fig. R4. Plantas de <i>S. lycopersicum</i> cv. volgogradsky (A) y <i>S. pimpinellifolium</i> (B) no tratadas (izquierda) y tratadas 1 día (centro) o 7 días (derecha) con 130 mM de NaCl.	pag 198

- Fig. R5. Contenido de Na⁺ y K⁺ en raíz, tallo y hojas de plantas *S. pimpinelifolium* y *S. lycopersicum* cv. volgogradskijpag 200
- Fig. R6. Expresión relativa de LeNHX1 en raíz, tallo y hojas en plantas de *S. pimpinelifolium* y *S. lycopersicum* cv volgogradskij....pag 202
- Fig. R7. Expresión relativa de LeNHX2 en raíz, tallo y hojas en plantas de *S. pimpinelifolium* y *S. lycopersicum* cv volgogradskij....pag 203
- Fig. R8. Expresión relativa de LeNHX3 en raíz, tallo y hojas en plantas de *S. pimpinelifolium* y *S. lycopersicum* cv volgogradskij....pag 204
- Fig. R9. Expresión relativa de LeNHX4 en raíz, tallo y hojas en plantas de *S. pimpinelifolium* y *S. lycopersicum* cv volgogradskij....pag 205
- Fig. R10. Crecimiento de células de *S cerevesiae*, cepas W303 y WX1(Δ nhx1), no transformadas y transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores LeNHXs con tag H6-V5, clonados en el vector pYES-DEST52 en Higromicina.....pag 207
- Fig. R11. Crecimiento de células de *S cerevesiae*, cepas ANT3 y AXT3 (Δ ena1-4, Δ ha1, Δ nhx1) no transformadas y transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores LeNHXs con tag H6-V5, clonados en el vector pYES-DEST52 en NaCl.pag 209
- Fig. R12. Crecimiento de células de *S cerevesiae*, cepas ANT3 y AXT3 (Δ ena1-4, Δ ha1, Δ nhx1) no transformadas y transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores LeNHXs con tag H6-V5 clonados en el vector pYES-DEST52 en KCl.....pag 211

- Fig. R13. Crecimiento de células de *S cerevesiae*, cepas AXT3 y AXT4 (Δ ena1-4, Δ nha1, Δ nhx1, Δ kha1) no transformadas y transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores LeNHX etiquetados con H6-V5, clonados en el vector pYES-DEST52.....pag 213
- Fig. R14. Complementación por LeNHX2 de la sensibilidad a Higromicina y NaCl.....pag 215
- Fig. R15 Complementación por LeNHX4 de la sensibilidad a Higromicina y NaCl.pag 216
- Fig. R16. Tinción con Sypro® Ruby-Protein (Bio-Rad) (A) e inmunodetección utilizando un anticuerpo frente al epítipo RGSH4 (B) de una separación por SDS-PAGE de las proteínas LeNHX2, 3 y 4 y AtNHX1.....pag 218
- Fig. R17. Actividad antiporte de LeNHX2 y LeNHX4.....pag 220
- Fig R18. Actividad de los antiportadores, reconstituidos en proteoliposomas, en función de diferentes concentraciones de NaCl o KCl, expresado como velocidad de alcalinización (Δ pH/ Δ t).....pag 222
- Fig. R19. Actividad antiporte de LeNHX2 y LeNHX4 en presencia de diferentes cationes.....pag 223
- Fig. R20. Localización subcelular de LeNHX2-GFP.....pag 224
- Fig. R21. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla de la proteína de fusión LeNHX3-GFP visualizada en un microscopio de epifluorescencia(20x).....pag 225.
- Fig R22. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla del marcador G-rk visualizado en un microscopio de epifluorescencia (40x (Panel A y B), 10x (Panel C)).....pag 226
- Fig. R23 Imagen obtenida de una única sección de células epidérmicas de cebolla, iluminadas con luz visible y visualizada en un microscopio de epifluorescencia (40x).....pag 227

Fig R24. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla de la proteína de fusión LeNHX4-GFP visualizada en un microscopio de epifluorescencia(20x (Panel A y B), y 40x (Panel C, D, E y F)).....pag 229

Fig R25. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla de la proteína de fusión AtNHX2-GFP (construcción cedida por la Doctora Beatriz Cubero del IRNAS (Sevilla) visualizada en un microscopio de epifluorescencia (20x (Panel A y B), y 40x (Panel C, D)).....pag 230

Fig R26. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla de la proteína de fusión GFP-LeNHX4 visualizada en un microscopio de epifluorescencia(20x (Panel A y B), y 40x (Panel C y D)).....pag 232

Fig. R27. Detección de LeNHX2 en plantas de *Arabidopsis* no transformadas (1) y líneas transformadas 243C (2), 213C (3) y 357A (4).....pag 234

Fig. R28. Inmunodetección de LeNHX2 tras purificar la proteína a partir de membranas microsomales.....pag 235

Fig R29. Actividad antiporte Cation/H⁺pag 237

Fig. R30. Plantas de *Arabidopsis* no transformadas y transgénicas tras 6 semanas de cultivo en vermiculita y riego con solución de sales MS.pag 238

Fig. R31. Plantas de *A. thaliana* control y transgénicas (LeNHX2) cultivadas durante tres semanas en medio MS (+K⁺) o medio MS modificado respecto a la concentración de K⁺ (100 μM de NO₃K) (-K⁺).....pag 240

Fig. R32. Plantas de *A. thaliana* control y transgénicas (LeNHX2) cultivadas durante tres semanas en medio MS suplementado con 50 mM NaCl.....pag 243

- Fig R33. Contenido iino en raices y parte aérea de plantas de *Arabidopsis Thaliana* transgénicas y controles.....pag 246
- Fig. R35. Comparación entre plántulas no transformadas y transformadas con la construcción de silenciamiento crecidas en medio de germinación con o sin kanamicina.....pag 248
- Fig. R36. Detección de la construcción para el silenciamiento de LeNHX2 en plantas de tomate.....pag 249
- Fig. R37. Niveles de expresión del gen LeNHX2, cuantificado mediante PCR a tiempo real, en una planta no transformada y en plantas transgénicas que portan la construcción para el silenciamiento.....pag 250
- Fig. R38. Plantas de tomate silenciadas y no transformadas cultivadas durante 2 meses.....pag 252
- Fig. R39. La presencia de la construcción de silenciamiento para LeNHX2 en la tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de la planta.....pag 253
- Fig. R40. Cuantificación, mediante PCR a tiempo real, de la expresión de LeNHX2 en plantas de tomate no transformadas y en las líneas silenciadas.....pag 254
- Fig R42. Peso fresco de raíz, tallo y hojas de plantas no transformadas y silenciadas (T1) de las líneas L7, L11, L12, L14 y L44 cultivadas en sistema hidropónico durante tres semanas, las dos últimas con 130 mM de NaCl.....pag 257

Tablas

- Tabla R1. Características de los EST con homología a los antiportadores AtNHX1-6, LeNHX1 y LeNHX2.....pag 188

Tabla R2. Pesos fresco y seco de raíz, tallo y hojas de plantas de <i>S. lycopersicum</i> cv volvoegradski y <i>S. Pimpinelifolium</i> no tratadas y tratadas con NaCl durante 1 y 7 días.	pag 199
Tabla R3. Pesos fresco y seco de plantas de <i>A. thaliana</i> control y transgénicas cultivadas durante 6 semanas en medio MS y en medio MS modificado respecto a la concentración de K^+ (100 μ M de NO_3K).....	pag 241
Tabla R4. Pesos fresco y seco de plantas de <i>A. thaliana</i> control y transgénicas cultivadas durante 6 semanas en medio MS modificado respecto a la concentración de K^+ (100 mM de NO_3K).....	pag 242
Tabla R5. Pesos fresco y seco de plantas de <i>A. thaliana</i> control y transgénicas cultivadas durante 6 semanas en medio MS suplementado con 50 mM de NaCl.	pag 243
Tabla R6. Pesos fresco y seco de plantas de <i>A. thaliana</i> control y transgénicas cultivadas durante 6 semanas en medio MS modificado para la concentración de K^+ (100 μ M de NO_3K) y suplementado con 50 mM de NaCl....	pag 244
Tabla R7. Porcentaje de silenciamiento de LeNHX2 en las líneas transgénicas y su relación con la producción de frutos y semillas.....	pag 251
Tabla R8. Peso fresco de raíces, tallos y hojas de plantas no transformadas y plantas de tomate transformadas con la construcción del silenciamiento de LeNHX2 (T1) cultivadas en sistema hidropónico durante 3 semanas, en ausencia y en presencia las dos últimas semanas de 130 mM de NaCl.....	pag 256

Introducción y Objetivos

La capacidad de las plantas para completar su ciclo de vida no solamente depende de la absorción de minerales esenciales, sino también de la adecuada distribución de los iones en tejidos, células y orgánulos en cada etapa del desarrollo. Esta complejidad se ve reflejada en el elevado número de transportadores iónicos identificados en los genomas de plantas. A pesar de la existencia de este elevado número de transportadores en plantas, actualmente se desconoce la función de la mayoría de ellos. Por ello el objetivo general de este trabajo ha sido la identificación y caracterización funcional de transportadores iónicos en una especie de interés agronómico como el tomate.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos son:

- 1. Clonación de posibles antiportadores Cation/H⁺ de tomate de la familias NHX.**
- 2.- Caracterización mediante expresión heteróloga en levadura.**
- 2. Desarrollo de ensayos funcionales utilizando proteínas purificadas y reconstituidas en liposomas para determinar su función bioquímica.**
- 3. Localización subcelular de los antiportadores mediante estudios de expresión transitoria.**
- 4. Determinación de la función fisiológica del antiportador K⁺/H⁺ LeNHX2 por sobreexpresión en Arabidopsis y silenciamiento génico en tomate.**

Antecedentes Científicos

1. Problemática de la salinidad en agricultura

El planeta Tierra, sin lugar a dudas, tiene un sabor salado. El agua salada, esto es, con una concentración de aproximadamente 30 g NaCl/l, ocupa un 71 % de la superficie de la Tierra (Flowers 2004, Dajic 2006). Por otro lado, más de 800 millones de hectáreas del planeta están afectadas por la salinidad, es decir, son suelos salinos o ricos en sodio (Munns 2005, Munns y Tester 2008), lo que representa casi un 10 % de la superficie terrestre total (Pessarakli y Szabolcs 1994, Shabala y Cuin 2007). La salinidad es muy frecuente en regiones áridas y semiáridas, que constituyen aproximadamente la mitad de la superficie terrestre (<http://www.undp.org/seed/unso/publication/dryland-population.pdf> Programa de Desarrollo de Naciones Unidas, Flowers 2004), aunque prácticamente en todas las regiones climáticas y en una amplia gama de altitudes se han encontrado suelos afectados por la salinidad (Dajic 2006).

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 asociada al desgaste de rocas antiguas que liberan estas sales, las hay de varios tipos, aunque fundamentalmente se trata de 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. 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). Se estima que aproximadamente un tercio de la superficie irrigada está afectada por la salinidad (Flowers 2004; Shabala y Cuin 2007). Esta salinización secundaria podría conducir a una progresiva degradación del suelo que quedaría inutilizado para la agricultura. Este proceso produce cada año el deterioro de aproximadamente 2 millones de Ha (1 % del suelo agrícola a escala mundial) (Tuteja 2007). 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).

El crecimiento de la población humana, que se espera alcance 9300 millones de habitantes en 2050, hace necesario un incremento de la producción global de alimentos en torno al 50 % en los próximos 40 años para asegurar la alimentación (<http://www.unfpa.org/swp/2001/>, Flowers, 2004). 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 agricultura se constata en el hecho de que de los actuales 230 millones de hectáreas de terreno sometido a irrigación, 45 millones (el 20 %) están afectados por la salinidad (<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>, Tabla A1).

Tabla 1. Distribución regional de suelos afectados por la salinidad (en millones de hectáreas) (Dajic 2006)

Regiones	Area Total (Mha)	Suelos afectados por la salinidad	
		(Mha)	%
Africa	1899	73	3,4
Asia y Australia	3107	444	14,3
Europa	2011	80	3,9
America Latina	2039	112	5,5
Oriente Próximo	1802	106	5,9
Norte America	1924	20	1,0
Total	12781	831	6,5
Salinización secundaria en la superficie irrigada del planeta		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 al NaCl de las plantas, ya sea por técnicas tradicionales de mejora, de éxito limitado, debido a la complejidad fisiológica y genética de este rasgo (Flowers 2004, Shabala y Cui 2007) o mediante uso de tecnologías de ingeniería genética (Tester y Davenport 2003).

2. Tolerancia a la salinidad en plantas

Las plantas se diferencian enormemente en su tolerancia a la salinidad, como reflejan sus diferentes respuestas de crecimiento frente al estrés salino (Munns y Tester 2008). Esta alta variabilidad en la tolerancia al estrés salino aparece 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) (Fig A1).

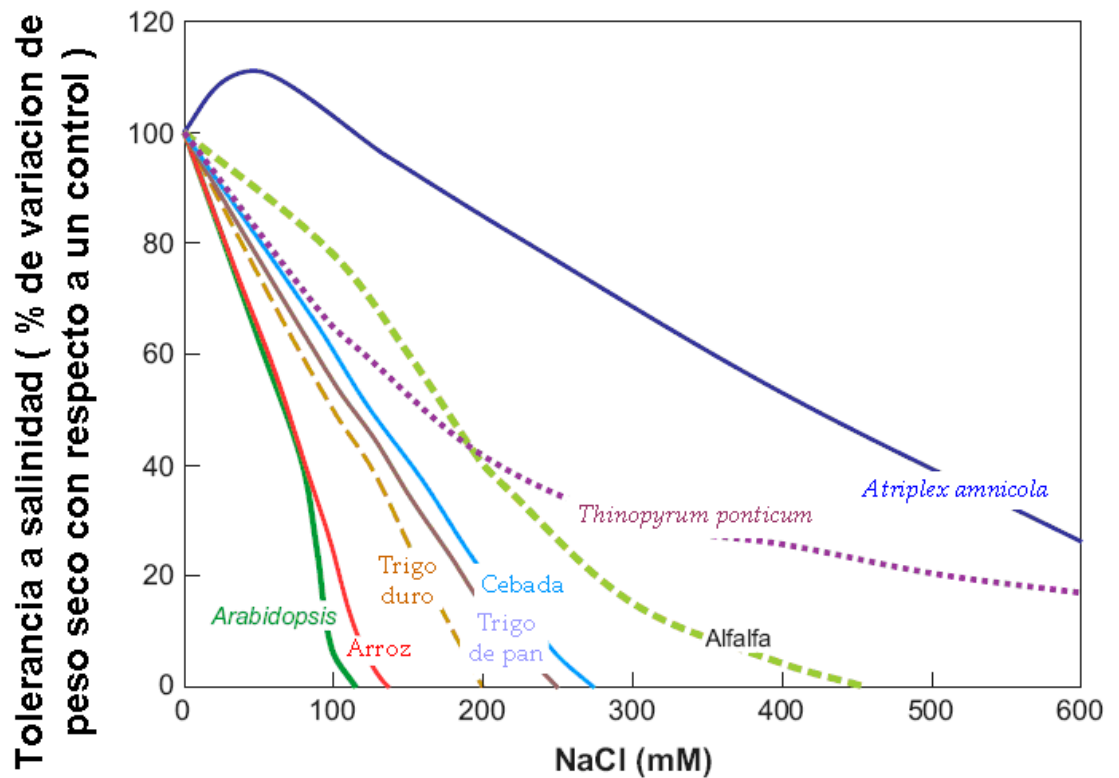


Fig. A1. Variación en el peso seco de la parte aérea de distintas especies de plantas cultivadas durante tres semanas en presencia de NaCl, respecto al valor de peso seco de plantas cultivadas en ausencia de NaCl (Munns y Tester 2008).

Basándonos en su tolerancia al estrés salino, las plantas pueden clasificarse en dos grupos: a) halófitas, plantas que pueden resistir una concentración de sales en el suelo de hasta el 20 % (3,5 M), y que en la mayoría de los casos crecen de manera satisfactoria a concentraciones entre 2 y 6 % (0,3 y 1 M) de NaCl (Strogonov 1964) y b) glicófitas, plantas que exhiben daños en diverso grado y un crecimiento limitado a una concentración de sales mayor al 0,1 % (17,5 mM). Sin embargo, dentro de

cada grupo hay grandes diferencias en el nivel de tolerancia al estrés salino, así hay especies halófitas moderadamente tolerantes y otras muy tolerantes (Waisel 1972, Flowers et al 1977; Munns et al 1983, Ungar 1991) y especies glicofitas muy sensibles y moderadamente sensibles (Greenway y Moons 1980; Dajic 2006).

Los mecanismos celulares que utiliza la planta para el crecimiento en condiciones de salinidad son similares en plantas halófitas y no-halófitas (Binzel et al 1989), si bien las especies halófitas parecen ser más eficientes en la utilización de estos mecanismos. En general, las plantas sensibles a salinidad restringen la toma de sal y mantienen el equilibrio osmótico mediante la síntesis de solutos compatibles como prolina, glicina-betaína (GB) o azúcares (Munns y Tester 2008); mientras que las plantas tolerantes a la salinidad utilizan iones para el ajuste osmótico ya que tienen la capacidad de secuestrar y acumular estos iones en las vacuolas de las células (Flowers et al. 1977; Yeo 1998; Glenn et al. 1999), previniendo así su acumulación en el citosol y favoreciendo una adecuada razón K^+/Na^+ citosólica.

A menudo, las plantas que toleran ambientes salinos son capaces de excluir Na^+ de la parte aérea y simultáneamente mantener altos niveles de K^+ (Greenway 1962; Gorham 1990; Schachtman et al 1992; Colmer et al 1995; Dubcovsky et al 1996; Munns et al 2000b; Flowers y Hajibagheri 2001; Zhu et al 2001). Este mecanismo es muy frecuente entre especies de gramíneas, aunque con excepciones como el maíz o el arroz (Yeo et al. 1987, Alberico y Cramer 1993; Cramer et al. 1994; Yadav et al. 1996; Yeo et al 1999). Las especies dicotiledóneas presentan mayor variación que las monocotiledones

en el grado de correlación entre la tolerancia a la salinidad y la baja concentración de Na^+ en parte aérea. Muchas plantas halófitas dicotiledoneas muestran una clara tendencia a acumular altas concentraciones de Na^+ en la parte aérea ya que lo utilizan como osmolito (Flowers y Yeo 1986; Glenn et al. 1999). Sin embargo, las halófitas monocotiledóneas tienden a mantener la concentración de K^+ en parte aérea más alta que la de Na^+ . Esta diferencia se explica en base a la mayor capacidad de almacenamiento de Na^+ en vacuola y el menor requerimiento de K^+ para el metabolismo citosólico en dicotiledoneas respecto a monocotiledoneas, las cuales presentan menor capacidad de almacenaje de Na^+ , y requieren más K^+ y osmolitos compatibles presentes en el citosol (Flowers y Yeo 1988; Glenn et al 1999; Tester y Davenport 2003).

Las plantas halófitas son mucho más eficaces que las glicófitas en el control de la entrada de Na^+ por la raíz, la traslocación de Na^+ a la parte aérea y la compartimentalización vacuolar del mismo, evitando así efectos osmóticos y citotóxicos que pueden conducir a la muerte de la planta (Tester y Davenport 2003). Un objetivo importante en la investigación de la tolerancia de las plantas a la salinidad consiste en identificar los transportadores implicados en el control de la entrada, salida o compartimentación de Na^+ , lo que permitiría seleccionar variedades tolerantes o mejorar la tolerancia en plantas transgénicas (Zhu 2001; Dajic 2006).

3. Efectos de la salinidad sobre las plantas.

La salinidad afecta a la planta a niveles morfológico, fisiológico y molecular (Waisel 1972; Flowers et al 1977; Greenway y Munns 1980; Munns et al 1983; Ungar 1991; Yeo 1998; Hasegawa et al 2000; Zhu 2000; Munns 2002; Xiong y Zhu 2002; Yokoi et al 2002a; Tester y Davenport 2003; Dijac 2006). La alta salinidad interfiere con el crecimiento de planta y su desarrollo (Zhu 2002), conduciendo a 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 conduce al establecimiento de una zona de bajo potencial hídrico que dificulta la absorción de agua por la planta debido al efecto hiperosmótico ejercido por la sal en el medio de crecimiento de las raíces (Zhu 2002, Tuteja 2007). Por tanto, la acción negativa de la sal sobre la planta se debe a su efecto osmótico e iónico (Munns y Tester 2008).

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, en plantas sensibles el efecto osmótico 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; Tester y Davenport 2003). 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 pierde agua, por lo que para mantener la actividad citosólica, el agua pasa desde la vacuola al citosol,

28

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 2007; 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 alta salinidad también provoca en la planta toxicidad iónica (Zhu 2002; Munns y Tester 2008), ya que conduce a la acumulación de Na^+ y Cl^- en el citosol de la célula que puede ser, en última instancia, perjudicial para la misma. En algunas plantas perennes, sobre todo leñosas (como los cítricos y la vid), el Na^+ es almacenado en las raíces y tallos leñosos, mientras que el Cl^- se acumula en las ramas jóvenes, siendo más perjudicial para la planta (Flowers 1988). Sin embargo, para muchas plantas, entre ellas las gramíneas, el 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 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 Na^+ depende de su tasa de acumulación en hojas, y de la eficacia de su compartimentalización en células de la hoja.

A bajas concentraciones de 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 NaCl o en especies sin capacidad de regular el transporte de Na^+ , el efecto iónico domina sobre el efecto osmótico (Munns y Tester 2008). Los efectos tóxicos del ión Na^+ muestran mayor variabilidad intraespecífica que los efectos osmóticos del NaCl (Munns 2002; Tester y Davenport 2003).

La respuesta de la planta al estrés salino ocurre en dos fases: una respuesta rápida debida al aumento de presión osmótica externa (fase osmótica), y una respuesta lenta debida a la acumulación de Na^+ en hojas (fase iónica) (Fig A2). Algunos componentes de la respuesta al estrés iónico son comunes con el estrés osmótico, así por ejemplo algunos antiportadores Na^+/H^+ de tonoplasto son activados por estrés osmótico (Tester y Davenport 2003).

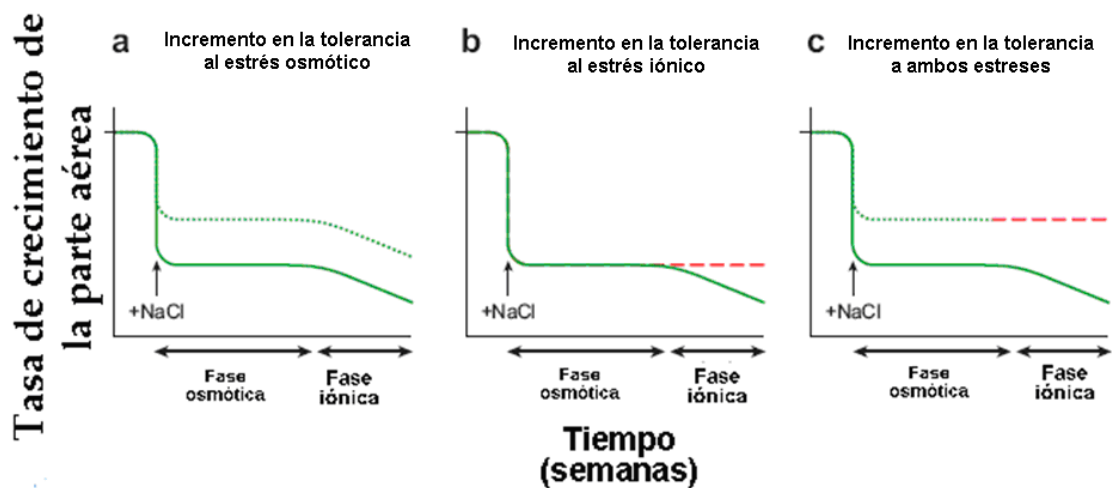


Fig A2. Efecto del estrés salino sobre la tasa de crecimiento de las plantas: repuesta rápida (fase osmótica) y repuesta lenta (fase iónica). La línea continua verde representa el cambio de la tasa de crecimiento después de la adición de NaCl. (a) La línea verde discontinua representa la respuesta hipotética 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 (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 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 K^+ , lo

que impide la toma de este macronutriente. Por otro lado, el componente osmótico de la salinidad junto a los efectos perjudiciales del 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 Na^+ en la toma de K^+ conlleva una alteración en la razón K^+/Na^+ de la célula. Los iones potasio son esenciales para el equilibrio osmótico y el balance electrostático de las células y sus compartimentos, la función de muchas enzimas, o la síntesis de proteínas (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 (Bhandal y Malik 1988; Murguía et al 1995; 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 1985; Trejo et al 1993; Albisnki et al 1996; 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).

4. Mecanismos de tolerancia a la salinidad

Los mecanismos de tolerancia a la salinidad se pueden clasificar en dos categorías: tolerancia a estrés osmótico y tolerancia a estrés iónico.

4.1. Tolerancia al componente osmótico de la salinidad

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 equilibran su potencial hídrico perdiendo agua, lo que provoca una disminución del potencial osmótico y de la turgencia. Esta situación genera señales intracelulares como síntesis de ABA o aumento del 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). 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; Rodas 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) (Rodhes y Hanson 1993; Nuccio et al 1999). 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 planta.

Algunos tipos de proteínas también se han relacionado 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). Se desconoce en gran medida la función de osmotinas y dehidrinas en la tolerancia a la salinidad, aunque se piensa que estaría relacionada con el mantenimiento de la estructura de proteínas (Campbell y Near 1997). 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). 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). Por la importancia de los flujos hídricos en los procesos de ajuste osmótico celular, la actividad de las acuoporinas también tendría un papel clave entre los mecanismos de adaptación al estrés osmótico (Maurel y Chrispeels 2001). Las acuoporinas facilitan la toma de agua desde el medio y determinan la conductividad hidráulica de la raíz en respuesta a numerosos estreses ambientales. La exposición de raíces a la salinidad induce cambios de la expresión de acuoporinas a múltiples niveles. Estos cambios incluyen una disminución coordinada a nivel transcripcional y una nueva localización subcelular de las proteínas PIPs de la membrana plasmática y TIPs 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).

4.2. Tolerancia al componente iónico de la salinidad.

Las plantas responden al estrés iónico de dos maneras:

- 1) Activando la exclusión de Na^+ a través de las raíces o de la lámina foliar y asegurando así que el Na^+ no se acumule a concentraciones tóxicas en las hojas.

- 2) Activando la compartimentalización de estos iones para evitar concentraciones tóxicas en el citoplasma.

La importancia relativa de estos mecanismos de tolerancia depende la especie, pero probablemente también del tiempo de exposición a la salinidad, la concentración de sal y las condiciones ambientales locales (disponibilidad de agua en el suelo y humedad del aire), así como de la tasa de transpiración y el potencial hídrico de las hojas.

4.2.1. Limitación de la acumulación de Na⁺: Exclusión de Na⁺

La exclusión de Na⁺ es un modo muy eficiente pero también complejo de prevenir la traslocación y acumulación de sales en las partes superiores de la planta. La exclusión está basada en una baja permeabilidad a los iones en la raíz, aún en presencia de altas concentraciones de NaCl, y en mecanismos de extrusión activos.

La exclusión de Na⁺ funciona a nivel celular y de planta entera (Munns et al 1983) y está relacionada con la regulación de la selectividad K⁺/Na⁺ (Jeschke y Hartung 2000). Muchas glicófitas mejoran su tolerancia al estrés salino incrementando la capacidad para excluir Na⁺ de la parte aérea, manteniendo altos niveles de K⁺ (Flowers y Hajibagheri 2001; Zhu 2001). Algunas plantas sensibles a la salinidad, como judía y maíz, son importantes excluidores de Na⁺ (Jacoby 1994; Bayuelo-Jiménez et al 2003). En estas plantas, los cultivares más tolerantes muestran una mayor capacidad para la exclusión de iones tóxicos (Fortmeier and Schubert 1995). Además, en especies moderadamente tolerantes, como el *Triticum aestivum* o el tetraploide *Triticum turgidum*, subespecie durum, la tolerancia a la salinidad está asociada con una baja tasa de transporte de Na⁺ a la parte aérea y una

alta discriminación K^+/Na^+ (Gorham 1990, Munns et al 2000; Munns y James 2003). Aunque el mecanismo de exclusión de Na^+ es característico de especies poco tolerantes a la salinidad, también se ha descrito en plantas halofíticas (Munns 2002) como *Avicennia marina* (Ball 1988).

La estrategia de exclusión de Na^+ se basa en la liberación selectiva de Na^+ en el xilema y su reabsorción desde la corriente de xilema. La acumulación neta de iones sodio en la planta es dependiente del equilibrio entre la entrada pasiva y el eflujo activo. Según Munns y colaboradores (2002), la capacidad de las plantas para regular la absorción y el transporte de sales es dependiente de los mecanismos siguientes: 1) selectividad en la absorción por las células de la raíz, 2) carga preferencial de K^+ sobre Na^+ en el xilema por las células de la estela, 3) descarga de las sales del xilema en las partes superiores de raíces, así como en el tallo y hoja y 4) carga del floema.

El movimiento pasivo de iones en raíces y en parte aérea es consecuencia de la transpiración (Flowers y Yeo 1992); sin embargo, en la endodermis, el movimiento radial de solutos debe producirse vía simplasto.

Yadav y colaboradores (1996) y Yeo y colaboradores (1999) observaron que plantas de arroz con un alto flujo apoplástico de agua presentaban altas concentraciones de Na^+ en la parte aérea. Esto indica que existe una ruta apoplástica para la entrada de Na^+ en la raíz, evitando el paso a través de la endodermis. Esto ocurre en puntos de crecimiento de raíces secundarias y ápices de raíz. El grado en el que contribuye este flujo apoplástico al influjo total de Na^+ varía con la especie, por ejemplo en arroz es aproximadamente diez veces mayor que en trigo (García et al 1997). La importancia de la ruta

apoplástica en la toma de Na^+ a nivel de la planta entera esta apoyada por observaciones clásicas. Así, es conocido que las plantas halófitas presentan gran número de adaptaciones anatómicas para reducir al mínimo la entrada apoplástica de sal en la planta. En este sentido, la anchura de la banda de Caspari es de dos a tres veces mayor en halófitos que en no-halófitos (Poljakoff-Mayber 1975) y la capa interior de células corticales puede diferenciarse en una segunda endodermis (Stelzer y Läuchli 1977).

Para reducir al mínimo el transporte de Na^+ a la parte aérea, los procesos de transporte que tienen lugar en la cara externa e interna de la membrana celular de la barrera apoplástica, la endodermis o exodermis tendrían que darse en direcciones opuestas: las células de la cara externa tendrían que suprimir la entrada y/o aumentar el eflujo de Na^+ , en contraste con las células de la cara interna, que deberían maximizar la salida de Na^+ desde el xilema y/o reducir al mínimo la entrada de Na^+ al xilema (Tester y Davenport 2003).

La toma y distribución de iones sodio dentro de la raíz en gran parte está conectada con la de potasio y en muchas especies la tolerancia al estrés salino está más relacionada con una alta razón K^+/Na^+ que con el mantenimiento de concentraciones bajas de sodio (Maathuis y Amtmann 1999). Así, el eflujo de Na^+ en células del cortex de la raíz se estimula por K^+ (Jeschke 1972; Lazof y Bernstein 1999). En las raíces de *Kosteletzkya virginica* se ha observado que la baja relación Na^+/K^+ es debida no sólo a la exclusión de Na^+ , sino también a la mayor selectividad K^+/Na^+ , atribuida a un cambio

de la relación esteroides/fosfolípidos en las raíces de plantas cultivadas en condiciones salinas (Blits y Gallagher 1990).

4.2.2. Limitación de la acumulación de Na⁺: Retranslocación y distribución de los iones

La retranslocación de iones vía floema es un mecanismo potencialmente importante para prevenir su acumulación en hojas totalmente expandidas, aunque representa una amenaza para las hojas más jóvenes, que son los sumideros del floema. Las plantas sensibles a la salinidad mantienen una activa recirculación de sodio para excluirlo de la parte aérea. Esta exportación de iones desde la parte aérea a la raíz vía floema se ha demostrado en judía (Greenway y Munns 1980), *Trifolium alexandrinum* (Winter 1982), maíz (Lohaus et al 2000), cebada (Munns et al 1986), algodón (Gouia et al 1994) y *Lycopersicon pennellii* (Pérez-Alfocea et al 2000). La exportación al floema puede afectar al menos al 25 % del total de Na⁺ que se acumularía en la hoja, especialmente cuando el crecimiento disminuye y la demanda de iones decrece (Munns et al 1983).

Además, los niveles de Na⁺ se pueden mantener bajos en las hojas jóvenes mediante la acumulación de este catión en las hojas más viejas (Flowers y Yeo 1992; Munns 1993). En judía, los iones se acumulan en la raíz o en las partes inferiores de la parte aérea de la planta desde donde son devueltos a la raíz y excretados desde allí (Jacoby 1979). Este mecanismo de distribución intra-planta es característico de muchos halófitos que, debido a una transpiración limitada, pueden mantener un exceso de sales dentro de

sus raíces y partes inferiores de la parte aérea, previniendo la acumulación de iones en los tejidos fotosintéticos (Waisel 1972; Dajic 1996).

4.2.3. Limitación de la acumulación de Na⁺: Excreción de sal

La importancia de la lixiviación de iones del apoplasto de la hoja a través de la cutícula por la lluvia, la niebla o el rocío como mecanismo de respuesta al estrés salino es todavía confusa (Tukey 1970; Pennewiss et al 1997). Sin embargo, la excreción de sal puede estar asociada al desarrollo de estructuras especiales, sobre todo en las hojas, conocidas como glándulas de la sal, estructuras comunes a muchas plantas halofíticas de distintos géneros.

Las estructuras glandulares por lo general se encuentran extendidas por toda la parte aérea, aunque son más abundantes en las hojas. Dschida y colaboradores (1992) han descrito la excreción de sal por las glándulas como un proceso dependiente de la energía generada por la actividad H⁺-ATPasa de la membrana celular en *Avicennia germinans*. Además del bombeo activo de iones a las glándulas de la sal desde las células del parénquima empalizada y el parénquima acuífero, parece que simultáneamente también tiene lugar un proceso de transporte vesicular y exocitosis dando lugar a la liberación de iones en el espacio extracelular y subcuticular. La composición química de la secreción presente en glándulas de la sal (iones inorgánicos y compuestos orgánicos, como azúcares, aminoácidos y aminos) indica la posibilidad de que se produzcan pérdidas de compuestos provenientes del protoplasma, como consecuencia de una alteración en las membranas celulares durante el proceso de excreción (Ziegler y Lüttge 1967).

4.2.4. Acumulación de sales: Compartimentación vacuolar

Las especies halofíticas, con gran eficacia para almacenar iones en las vacuolas de las hojas, muestran un alto contenido de sales en la parte aérea. La capacidad de las plantas para transferir iones a la vacuola es dependiente de la proporción de tejidos y células vacuoladas, así como de la actividad de sistemas de transporte localizados en el tonoplasto, que previenen la concentración excesiva de iones en el citoplasma. La compartimentación vacuolar de iones permite un ajuste osmótico eficaz en condiciones salinas, así como la retirada de iones tóxicos del citosol, por lo que es uno de los factores claves en la tolerancia a la salinidad. Muchas especies halofíticas se caracterizan por sus grandes vacuolas (Hajibagheri et al 1984), las cuales posibilitan el acúmulo de sales en concentraciones muy altas (Dracup y Greenway 1985). La acumulación de Na^+ en la vacuola va acompañada de una acumulación de potasio y solutos orgánicos en el citoplasma para alcanzar y mantener el equilibrio osmótico e iónico entre estos dos compartimentos (Flowers et al 1977; Greenway y Munns 1980; Munns 2002).

4.2.5. Acumulación de sales: Suculencia

La suculencia es característica de muchos halófitos (Crawford 1989), y representa una forma muy eficaz de mitigar los efectos osmóticos y tóxicos de los iones mediante dilución. En las especies suculentas las concentraciones de sal en los tejidos se mantienen bajas en base al incremento de su contenido de agua y/o al aumento del crecimiento. Las alteraciones morfo-anatómicas

de halófitos con succulencia incluyen aumento de volumen de la célula, sobre todo de células del parénquima esponjoso y parénquima acuífero, aumento del grosor de la hoja y disminución en el número de estomas (Strogonov 1973, Rilke y Reimann 1996; Smekens y Vantienderen 2001, Parques et al 2002). La succulencia está asociada a la capacidad de compartimentalización intracelular de iones.

5. Transportadores de Na⁺

El movimiento de iones a través de la membrana plasmática, vacuolar y otras membranas intracelulares depende de la actividad de bombas primarias (ATPasas y pirofosfatasa), transportadores secundarios y canales iónicos (Niu et al 1995; Maathuis y Amtmann 1999) (Fig A3). Mientras que la entrada y el eflujo en las raíces establecen la tasa neta de entrada de Na⁺ en la planta, la compartimentalización de Na⁺ dentro de las vacuolas de las células y el transporte radial de Na⁺ a la estela y su carga en el xilema establecen el control homeostático del Na⁺ en el citosol de las células de la raíz. La retirada de Na⁺ de la corriente transpiratoria, su distribución dentro de la planta y su acumulación progresiva en las vacuolas de las hojas, determinará los efectos tóxicos de este catión (Apse y Blumwald 2007, Fig A3).

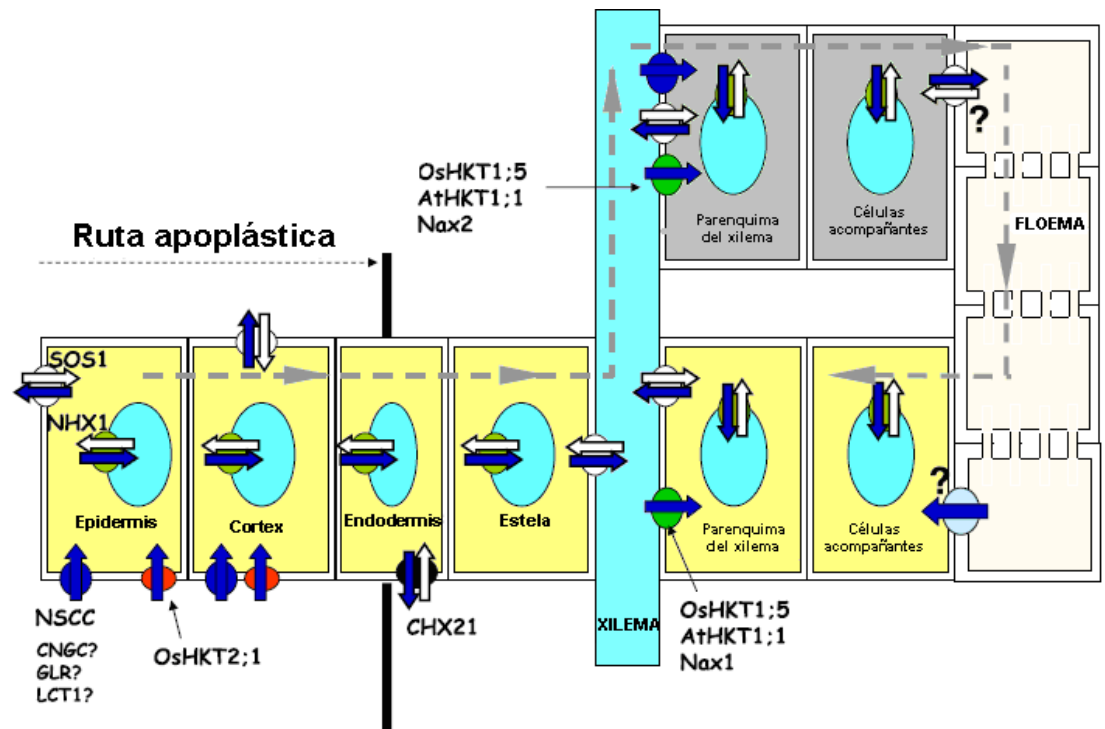


Fig A3. Movimiento de Na^+ en la planta. El diagrama muestra el transporte radial y longitudinal de Na^+ desde suelo a las raíces, y de aquí a la parte aérea por el xilema. El Na^+ entra en el citosol de las células de la raíz vía NSCC (canales de cationes no selectivos) y posiblemente a través de transportadores de tipo HKT. La concentración de Na^+ se mantiene baja en el citosol debido a la actividad de antiportadores Na^+/H^+ vacuolares (NHX1) y de membrana plasmática (SOS1). El antiportador catión/ H^+ CHX21 contribuye al movimiento del Na^+ desde las células endodérmicas hacia el apoplasto de la estela. En la estela, el Na^+ es cargado en el xilema por el antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática, SOS1. En la raíz, el Na^+ puede ser descargado desde el xilema vía uniportes selectivos de Na^+ (AtHKT1;1, OsHKT1;5, Nax1). En las hojas, el Na^+ puede ser descargado por uniportes selectivos de Na^+ (OsHKT1;5, AtHKT1;1 y Nax2), y canales NSCC. La concentración citosólica de Na^+ en hoja es mantenida por la acción de antiportadores Na^+/H^+ tipo NHX1 y SOS1. Los mecanismos para la carga y descarga del floema y la recirculación de Na^+ vía floema aún no se han determinado (tomado de Apse Blumwald, 2007).

5.1. Entrada de Na⁺

En condiciones fisiológicas, las plantas mantienen una alta razón K⁺/Na⁺ en su citosol con una concentración relativamente alta de K⁺ (100-200 mM) y baja de Na⁺ (1-10 mM) (Higinbotham 1973). Considerando la diferencia de potencial eléctrico en la membrana celular (-140 mV) (Higinbotham 1973), una subida de la concentración de Na⁺ extracelular establecerá un gran gradiente de potencial electroquímico de Na⁺ que favorecerá el transporte pasivo de este ión desde el medio al citosol, a través de sistemas uniporte o canales. Estudios fisiológicos indican que el Na⁺ entra en la célula a través de canales no- selectivos (Horie y Schroeder 2004). Estos sistemas incluyen los transportadores LCT1 (*Low affinity Cation Transporter 1*), y los canales NSCC (*Non Selective Cation Channels*).

LCT1, un transportador de cationes de baja afinidad, se aisló de trigo y se demostró que complementa un mutante de levadura deficiente en la toma de K⁺ (Schachtman et al 1997). Se especula que está implicado en la entrada de Na⁺ en condiciones de alta salinidad (Maathuis y Amtmann 1999; Daijic 2006). En levadura, LCT1 cataliza la entrada de diversos cationes, incluyendo Na⁺, Rb⁺ y Ca²⁺. 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 Ca²⁺ (Amtmann et al 2001). LCT1 puede ser un componente del influjo de Na⁺ sensible a Ca²⁺ en raíces de trigo, ya que no se satura a baja concentración externa de 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).

Por otra parte, numerosas evidencias electrofisiológicas apoyan la existencia de canales catiónicos no selectivos (NSCC, *Non-Selective Cation Channels*) como la ruta principal de entrada de Na^+ en las raíces cuando la concentración de NaCl es alta en suelo (Tester y Davenport 2003; Horie y Schroeder 2004). 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), y los GLRs (*Glutamate Receptor-like genes*, Tester y Davenport 2003; Demidchik et al 2004). 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 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 K^+ y Na^+ cuando se expresan en ovocitos de *Xenopus*, mostrando activación por nucleótidos cíclicos (Leng et al 2002; Balague et al 2003). AtCNGC2 parece ser selectivo para el K^+ (Leng et al 2002); mientras que AtCNGC10 restaura el transporte de K^+ en mutantes de *E. coli* y en levaduras defectivas en el transporte de K^+ , así como en el mutante akt1-1 de *Arabidopsis*, lo que indica que media en el transporte de K^+ en raíces. La expresión heteróloga en levadura indica que AtCNGC3 puede transportar Na^+ y K^+ (Gobert et al

2006). AtCNGC3 principalmente se expresa en las células de cortex y epidermis de raíz (Demidchik y Maathuis 2007).

En analogía a la situación en animales, se ha sugerido que las proteínas GLRs exhiben una conductancia iónica (Ca^{2+} , K^+ , 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 Na^+ y Ca^{2+} activadas por glutamato e independientes de voltaje, sugiriendo un papel de los canales GLRs en la entrada de Na^+ (Apse y Blumwald 2007).

5.2. Absorción de Na^+ y K^+ y redistribución en la planta

Inicialmente se había sugerido que los sistemas de absorción de K^+ estarían implicados en el influjo de Na^+ (Epstein et al 1963). Sin embargo, los canales de K^+ y sistemas de alta afinidad de absorción de K^+ como los transportadores KUP/HAK son relativamente específicos para K^+ (Santa-María et al 1997, Maser et al 2001, Bañuelos et al 2002, Vallejo et al 2005). Entre los sistemas de transporte de K^+ de alta afinidad, se ha demostrado el papel fundamental en la absorción y redistribución de Na^+ en la planta de las proteínas HKT (Schachtman y Schroeder 1994; Laurie et al 2002; Haro et al 2005.). La familia de transportadores HKT ha sido dividida en dos subfamilias (Platten et al 2006) que se diferencian en un aminoácido de la primera región *pore loop* de la proteína, el cual juega un papel determinando

la selectividad del catión. Las proteínas de la subfamilia 1 estarían implicadas en el transporte pasivo de Na^+ de baja afinidad. Las proteínas de la subfamilia 2 catalizan el transporte activo de K^+ o Na^+ de alta afinidad (Horie et al 2007; Munns y Tester 2008). Las proteínas HKT de la subfamilia 2 no se han identificado en plantas dicotiledoneas (Platten y col 2006).

El primer cDNA aislado de un transportador HKT ha sido HKT1 de trigo, renombrado HKT2;1 (Platten et al 2006). Se ha demostrado que HKT2;1 complementa el transporte de K^+ en una levadura deficiente en la absorción de K^+ (Schachtman y Schroeder 1994) y que su expresión en ovocitos de *Xenopus* y en levadura cataliza el simporte de alta afinidad Na^+/K^+ a concentraciones bajas de Na^+ ; mientras que a concentraciones elevadas de Na^+ , el transporte de alta afinidad de K^+ se inhibe, dando lugar a un uniporte de Na^+ de baja afinidad (Rubio et al 1995). Se ha comprobado que las plantas transgénicas de trigo que expresan una construcción antisentido de HKT2;1 crecen mejor en condiciones salinas y muestran menor absorción y acumulación de Na^+ que las plantas control (Laurie et al 2002). El gen HKT1;5 de trigo coincide con los *loci* de exclusión de Na^+ *Nax2* y *Kna1* que parecen jugar un papel en la recuperación de Na^+ desde el xilema (Davenport et al 2005, 2006; Byrt et al 2007).

El único transportador HKT identificado en *Arabidopsis* es *AtHKT1;1*. Cuando esta proteína se expresa en ovocitos de *Xenopus* o en levadura funciona como un uniporte selectivo para Na^+ , pero también complementa la toma de K^+ en un mutante de *E coli* deficiente en transportadores de K^+ , aumentando su acumulación. Ello sugiere algún papel de esta proteína en el

transporte de K^+ (Uozumi et al 2000). Los mutantes *Athkt1;1* son más sensibles a la salinidad que las plantas silvestres e hiperacumulan Na^+ en la parte aérea pero no en la raíz (Mäser et al 2002; Berthomieu et al 2003; Rus et al 2004). AtHKT1;1 se expresa en la membrana plasmática de células del tejido vascular en hojas, sobre todo en floema y xilema (Barthomieu et al 2003, Sunarpi et al 2005).

Se han formulado varias hipótesis sobre la función de AtHKT1;1 en *Arabidopsis*. Rus y colaboradores (2001) propusieron que AtHKT1;1 es una vía para la toma de Na^+ en la raíz. Sin embargo, aunque el Na^+ se acumula en un mutante *knockout* de AtHKT1;1, la absorción de Na^+ no se modifica, lo que sugiere que en *Arabidopsis* AtHKT1;1 no media de forma significativa el influjo de Na^+ (Berthomieu et al 2003; Essah et al 2003). Berthomieu y colaboradores (2003) demostraron la expresión de una proteína de fusión AtHKT1;1-GUS en el floema de raíz y hoja y propusieron que AtHKT1;1 funciona en la recirculación de Na^+ desde la parte aérea a la raíz, probablemente mediando la carga de Na^+ al floema en la parte aérea, y la descarga en raíces (Berthomieu et al 2003). Sin embargo, Sunarpi y colaboradores (2005) demostraron mediante microscopía inmunoelectrónica que AtHKT1;1 se localiza en la membrana plasmática de células del parénquima del xilema en la parte aérea y raíz, y propusieron que AtHKT1;1 interviene en la recuperación de Na^+ del xilema y que esta recuperación de Na^+ tiene algún efecto secundario sobre los niveles de Na^+ del floema. En la raíz, AtHKT1;1 estaría implicado en la recuperación de Na^+ del xilema antes de que éste alcance la parte aérea, mientras que en las hojas podría estar

implicado en la recirculación de Na^+ en el floema (Berthomieu et al 2003, Sunarpi et al 2005, Davenport et al 2007). Aunque AtHKT1;1 cataliza la entrada de Na^+ en células, a nivel de la planta entera causa una reducción del influjo neto de Na^+ a la parte aérea.

En arroz se han identificado nueve transportadores tipo HKT. El patrón de expresión de las proteínas de la subfamilia 2 sería compatible con un papel en la entrada de Na^+ por la raíz (Garcia-deblas et al 2003, Horie et al 2001). El gen OsHKT1;5 coincide con el gen SKC1, identificado como un QTL implicado en el mantenimiento de la homeostasis de K^+ en condiciones salinas en una variedad tolerante a la salinidad (Ren et al 2005). SKC1 se expresa en las células del parénquima del xilema y funciona como un transportador selectivo para el Na^+ . Por lo tanto, OsHKT1;5 podría tener un papel similar al de AtHKT1;1, recuperando Na^+ del xilema. OsHKT1;1 se expresa principalmente en la parte aérea y cataliza el transporte de Na^+ de baja afinidad en levaduras (Garcia-deblas et al 2003). Los miembros de la familia OsHKT2 parecen tener un papel en la entrada de Na^+ en la raíz. Tanto el transportador OsHKT2;1 como OsHKT2;2 se inducen en condiciones de carencia de K^+ , mientras que su expresión se inhibe en presencia de NaCl (Horie et al 2001; Kader et al 2006). Recientemente se comprobó que el transportador OsHKT2;1 cataliza la absorción activa de Na^+ en raíz con alta afinidad en condiciones de carencia de K^+ , demostrando que en estas condiciones el Na^+ puede reemplazar parcialmente al K^+ (Horie et al 2007, Garcia-deblas et al 2003). Altas concentraciones de K^+ inhiben el transportador (Garcia-deblas et al 2003), mientras que a altas concentraciones de Na^+ la

expresión del transportador se reduce fuertemente para evitar niveles tóxicos de Na^+ en la planta. OsHKT2;2 cataliza el transporte acoplado de K^+ y Na^+ (Horie et al 2001). La expresión de OsHKT2;1 y OsHKT2;2 se regula de forma distinta por el estrés salino en las variedades de arroz BRR1 Dhan29 y Pokkali, sensible y tolerante a la salinidad, respectivamente (Kader et al 2006).

Otros transportadores de alta afinidad de K^+ de la familia KUP/HAK/KT parecen tener también capacidad de mediar el transporte de Na^+ de baja afinidad a concentraciones elevadas de Na^+ , aunque su permeabilidad a Na^+ es demasiado baja para explicar las velocidades de influjo de Na^+ observadas en condiciones salinas (Santa-María et al 1997). Sin embargo, los niveles de transcripción y la actividad de varios de los transportadores de este grupo se modifican en condiciones salinas. HAK1 de cebada expresado en levadura interviene en el transporte de Na^+ de baja afinidad y en la toma de K^+ de alta afinidad (Santa-María et al 1997). En experimentos de expresión heteróloga se ha demostrado que concentraciones elevadas de Na^+ inhiben el transporte de K^+ por AtKUP1 (Fu y Luan, 1998) y AtHAK5 (Rubio et al 2000). También se ha observado que la transcripción de KUP2 disminuye en la parte aérea de plantas tratadas con NaCl (Maathuis 2006). Por otra parte, tanto la carencia de K^+ como el estrés por NaCl aumentan los niveles de expresión de las proteínas McHAK1 y McHAK2 de *Mesembryanthemum crystallinum* (Su et al 2002). Estas isoformas parecen estar implicadas en el mantenimiento de los niveles de K^+ citoplasmático y/o en la

regulación del turgor bajo condiciones en las que el Na^+ externo inhibe la toma de K^+ y el Na^+ celular reemplaza al K^+ .

5.3. Exclusión activa de Na^+

En presencia de niveles elevados de Na^+ fuera de la raíz o de la célula, el gradiente electroquímico hace que la toma de Na^+ sea pasiva y que el eflujo de Na^+ sea un proceso activo. Mientras la extrusión de sodio en hongos y animales, se realiza de forma muy eficaz a través de Na^+ -ATPasas y ATPasas Na^+/K^+ , respectivamente, estas bombas están ausentes en plantas superiores (Horie y Schroeder 2004), si bien se han descrito Na^+ -ATPasas en el musgo *Physcomitrella patens* (Benito y Rodríguez-Navarro 2003). Ello sugiere que este mecanismo de extrusión de Na^+ 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^+ (Benito y Rodríguez-Navarro 2003). En plantas, la exclusión de Na^+ del citoplasma mediante acumulación en la gran vacuola central, donde además contribuye al mantenimiento del turgor, es un mecanismo eficaz para evitar los efectos negativos de la salinidad. La extrusión de Na^+ en plantas se realiza por un proceso de transporte activo secundario, un sistema de antiporte Na^+/H^+ localizado en la membrana plasmática o tonoplasto. Aunque existían numerosas evidencias de la presencia de sistemas de antiporte Na^+/H^+ en estas membranas, la identificación de genes que codifican posibles antiportadores Na^+/H^+ 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^{2+} , Na^+ , K^+ y Mg^{2+} por H^+ (Mäser et al 2001). La familia CaCA está formada por once miembros que parecen estar relacionados con el transporte de iones divalentes, como Ca^{2+} , Cd^{2+} y Mn^{2+} (Cheng et al 2002). La familia NhaD cuenta con tan sólo dos miembros. Se ha demostrado que la proteína homóloga de *Physcomitrella* tiene una localización cloroplastídica. Estudios de complementación en mutantes deficientes en el transporte de K^+ y Na^+ sugieren la implicación de esta proteína en la absorción de K^+ y el eflujo de Na^+ , mediando una actividad de transporte $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{K}^+-\text{H}^+$, parecida a la descrita para la proteína GerN (Ottow et al 2005, Barrero-Gil J 2007). Las proteínas de las subfamilias CPA1 y CPA2 contienen un dominio de intercambio Na^+/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 no ha sido aún determinada. Los transportadores de la familia CHX, NHX y SOS están implicados en el transporte de Na^+ , Li^+ y K^+ en plasmalema, tonoplasto, compartimentos

endosomales y cloroplastos, y juegan papeles esenciales en la homeostasis intracelular de K^+ , Na^+ y H^+ (Wu et al 1996; Bressan et al 1998; Darley et al 2000; Shi et al 2000; Qui et al 2002; Quintero et al 2002; Shi et al 2002a; 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 2005; Leidi et al 2005; Shabala et al 2005; Hall et al 2006; Maresova y Sychrova 2006; Apse y Blumwald 2007; Davenport et al 2007; Padmanaban et al 2007; Rodríguez-Rosales et al 2008; Zhao et al 2008; Olías et al 2009).

5.4. Eflujo de Na^+ a nivel de la membrana plasmática

El primer antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática identificado en plantas es el sistema SOS1 (Shi et al 2000). SOS1 forma parte de la ruta de señalización SOS (*Salt Overlay Sensitive*), identificada en *Arabidopsis* en un escrutinio de mutantes hipersensibles a estrés salino (Wu et al 1996), y que constituye un módulo funcional (Quintero et al 2002) que controla los flujos de Na^+ a través de la membrana celular (Bressan et al 1998). La ruta SOS está constituida por los productos génicos de SOS1, SOS2 y SOS3. Por clonaje posicional se determinó que SOS3 codifica una proteína sensora de Ca^{2+} parecida a la subunidad reguladora de la calcineurina (Liu y Zhu 1997; Ishitani et al 2000; Tester y Davenport 2003; Fig A4). De la misma manera se determinó que SOS2 codifica una proteína kinasa (Liu et al 2000; Fig A4) y que SOS1 codifica un antiportador Na^+/H^+ (She et al 2000, Qiu et al 2002; Quintero et al 2002; Shi et al 2002; Fig A4). La ruta SOS se expresó en

levadura, demostrándose que SOS3 se une a la membrana plasmática mediante un dominio miristoilado. En presencia de Ca^{2+} , SOS3 interacciona con SOS2, lo que provoca el reclutamiento de SOS2 a la membrana, donde puede fosforilar a SOS1 activando la extrusión de Na^+ de la célula (Quintero et al 2002; Fig A4).

Aunque el mecanismo de señalización del estrés iónico y osmótico no ha sido completamente esclarecido, se sabe que la respuesta al aumento de Na^+ en el medio de crecimiento de las raíces es un aumento del Ca^{2+} citosólico libre (Kiegle et al 2000; Knight et al 1997, 2000; Moore et al 2002; Tracy et al 2008). De esta forma, el aumento de Ca^{2+} provocado por el estrés salino activaría la extrusión de Na^+ por SOS1. Se han descrito mutantes *sos3* de *Arabidopsis* que expresan una proteína menos sensible a Ca^{2+} y que por tanto requieren concentraciones más altas de Ca^{2+} extracelular que las plantas silvestres para la activación de SOS3, lo que conduce a una hipersensibilidad a NaCl de estos mutantes (Zhu 2002; Tuteja 2006).

Además de su papel como transportador de Na^+ , SOS1 tiene un dominio citosólico que podría funcionar como sensor de Na^+ , lo que abre la posibilidad de una regulación *feed-back* por SOS1 de la ruta de señalización SOS (Zhu 2002; Tester y Davenport 2003).

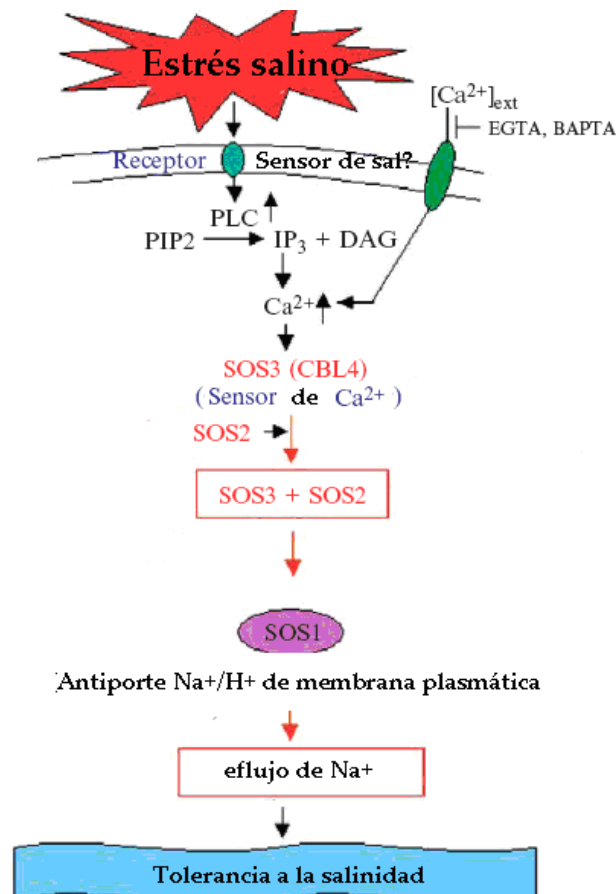


Fig A4. Modelo de control de la homeostasis iónica por proteínas de la ruta SOS. El exceso de Na⁺ externo es percibido por un receptor de naturaleza desconocida que activa la enzima fosfolipasa C (PLC) específica de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂). La actividad de esta enzima genera inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), segundos mensajeros que transmiten la señal intracelularmente, provocando un aumento del Ca²⁺ citoplasmático libre que se une a las proteínas receptoras de este catión como SOS3. La proteína SOS3, activada mediante unión de Ca, interacciona con la proteína quinasa SOS2, que cataliza la fosforilación de SOS1, activándose así el antiporte Na⁺/H⁺ y, en consecuencia, la extrusión de Na⁺ (tomado de Tuteja 2007).

En *Arabidopsis* se ha demostrado el papel de SOS1 en la homeostasis de Na⁺ y K⁺ (Shi et al 2002a), así como en el control del transporte a larga distancia de Na⁺ en el xilema (Shi et al 2002a). El mutante *sos1* es hipersensible a sal y muestra un desequilibrio osmótico/iónico (Tuteja 2006). Este mutante presenta además menor actividad de intercambio Na⁺/H⁺ en vesículas de membrana plasmática de raíz que las plantas de *Arabidopsis* silvestre (Qiu et al 2003).

Se ha observado que SOS1 se expresa en ápices y en tejidos vasculares de raíz donde el antiportador Na⁺/H⁺ que codifica desempeña un papel en el eflujo de Na⁺ al exterior y a la corriente transpiratoria, respectivamente (Shi et al 2002; Chinnusamy et al 2005). La expresión en la parte aérea también indica una localización predominantemente vascular.

En hojas, la actividad SOS1 se ha medido después de tratar las plantas con sal porque los niveles de mRNA son muy bajos en ausencia de tratamiento salino en comparación a los niveles de mRNA en raíces (Shi et al 2000). Las plantas transgénicas que sobrepresan SOS1 muestran un aumento drástico de la expresión de este gen en relación con el tipo silvestre en condiciones de estrés salino y sólo en estas condiciones, sugiriendo que la estabilidad del mRNA de SOS1 se regula por NaCl (Shi et al 2003).

Se ha observado que los mutantes *sos1* muestran una concentración más alta de Na⁺ en la raíz y más baja en el fluido xilemático que las plantas silvestres cuando se cultivan ambas en condiciones salinas (Shi et al 2000, 2002; Davenport et al 2007). En el caso del fluido xilemático el menor contenido en Na⁺ de las plantas mutantes respecto de las silvestres sólo se

observa a bajas concentraciones de NaCl (25 mM); mientras que en condiciones de alta salinidad (100 mM) el resultado es el contrario (Shi et al 2002). Este comportamiento se podría explicar si se considera que SOS1 controla el contenido de Na⁺ en el xilema, actuando de forma bidireccional. Así, en condiciones normales de crecimiento, SOS1 podría cargar activamente Na⁺ en el xilema para su translocación controlada a la parte aérea y su acumulación en el mesófilo foliar. Por el contrario, cuando el estrés sódico es importante, SOS1 podría expulsar Na⁺ al medio en el ápice de la raíz y reabsorber el Na⁺ del xilema en tejidos más diferenciados, retrasando así el aporte de Na⁺ a la parte aérea con la corriente de evapotranspiración (Shi et al 2002). Sin embargo, considerando la diferencia de pH entre el citosol de las células del parénquima estelar (pH 7,0) y el apoplasto del xilema (pH 6,0), la reabsorción de sodio por un intercambio electroneutro sólo sería posible si la concentración de Na⁺ es al menos 10 veces mayor en el xilema que en el citosol de la célula (Shi et al 2002; Munns y Tester 2008).

Los mutantes *sos1*, *sos 2* y *sos 3* muestran defectos en la nutrición de K⁺, siendo incapaces de crecer normalmente en medios con un aporte de sales de K⁺ inferior a 20 mM. La relación entre la toxicidad por Na⁺ y la deficiencia en K⁺ en mutantes *sos* aún no ha sido establecida, aunque la ausencia de actividad transportadora de K⁺ atribuible a SOS1 cuando éste se expresa en levadura sugiere que los efectos de la mutación *sos1* sobre el transporte de K⁺ son indirectos (Quintero et al 2002).

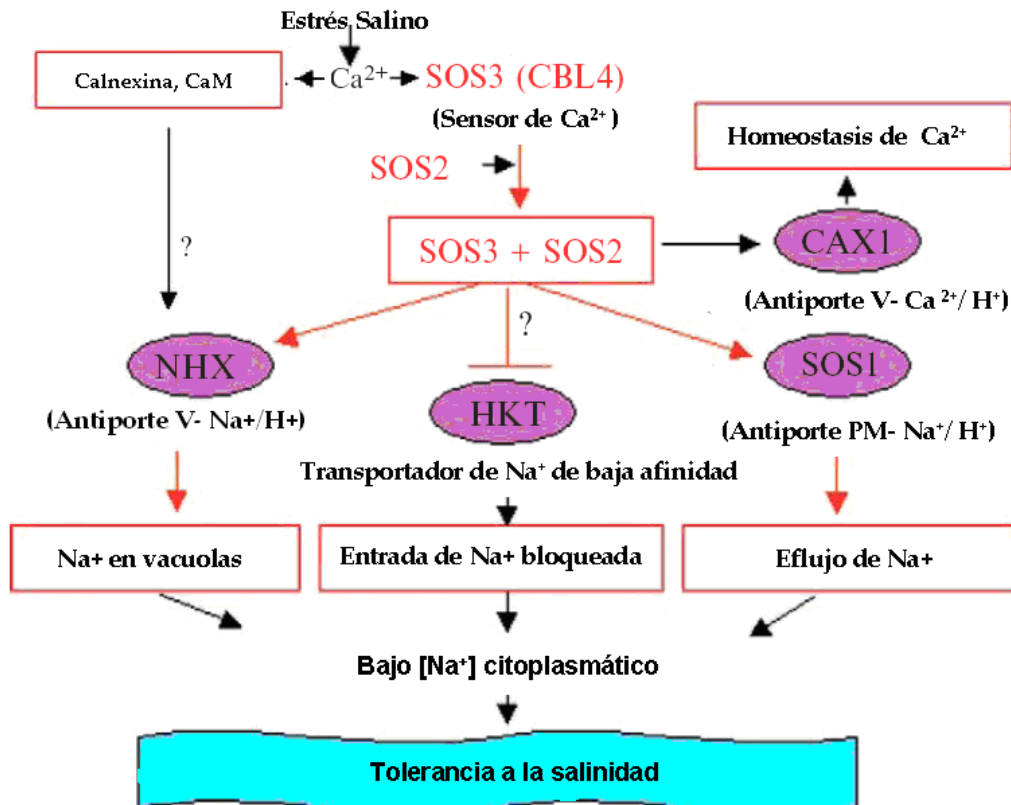


Fig A5. Implicación del complejo SOS3-SOS2 en la homeostasis del Na^+ y la tolerancia a la salinidad. El complejo SOS3-SOS2 inhibe la actividad HKT, restringiendo la entrada de Na^+ al citosol y activa los antiportadores Na^+/H^+ de la membrana plasmática, SOS1, y de la vacuola, NHX, provocando el eflujo de Na^+ y su acumulación vacuolar. Otras proteínas sensoras de Ca^{2+} como calnexina o calmodulina también pueden estar implicadas en la homeostasis del Na^+ , a través de la regulación de la actividad de NHX y de otros transportadores. El antiportador H^+/Ca^{2+} , CAX1, ha sido identificado como una diana de SOS2 implicado en la homeostasis citosólica de Ca^{2+} (tomado de Tuteja 2007).

Probablemente SOS2 aumenta la actividad de diferentes transportadores en condiciones de estrés salino (Daijic 2006). El hecho de que una mutación knockout *hkt1* suprime la sensibilidad a sal de mutantes de la ruta SOS (Rus et al 2001, 2004) indica alguna interacción entre la ruta SOS y

el funcionamiento de los transportadores HKT (Rus et al 2001, 2004; Fig A5). Se ha sugerido que SOS2 activa NHX, favoreciendo la acumulación del exceso de Na⁺ dentro de las vacuolas (Qiu et al 2004). El transportador CAX1 puede ser también regulado por SOS2 para restaurar la homeostasis de Ca²⁺ citosólico (Cheng et al 2003).

Todo ello refleja que la ruta SOS puede estar implicada en la actividad de diversos transportadores para mantener la homeostasis celular de iones y favorecer la tolerancia a la salinidad (Tuteja 2006).

En *Arabidopsis* existe un homólogo de SOS1, NHX8, que parece funcionar como antiportador de plasmalema transportando de forma específica Li⁺ (An et al 2007). Por otra parte, se ha demostrado la localización en la membrana plasmática de algunas proteínas de la familia CHX. La expresión de AtCHX21 en la membrana plasmática de las células de la endodermis indica que esta proteína juega un papel en el transporte de iones a este nivel (Hall et al 2006). Las plantas mutantes *Atchx21* presentan concentraciones de Na⁺ más bajas en el xilema, así como menor acumulación de Na⁺ en las hojas que las plantas silvestres, lo que sugiere que AtCHX21 contribuye al eflujo de Na⁺ desde las células endodérmicas hacia la estela (Hall et al 2006). También las proteínas AtCHX13 y AtCHX14 se localizan en la membrana plasmática, pero funcionarían en la absorción de K⁺ en situaciones de carencia de K⁺ (Zhao et al 2008).

5.5. Acumulación vacuolar de Na⁺ y K⁺

Se ha puesto de manifiesto la localización subcelular en membranas endosomales o tonoplasto de varias proteínas de las familias NHX y CHX (Apse et al 1999; Hamada et al 2001; Xia et al 2002; Yokoi et al 2002; 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 2006; Maresova y Sychrova 2006, Pardo et al 2006; Padmanaban et al 2007; Rodríguez-Rosales et al 2008; Zhao et al 2008). También las proteínas de la familia KEA tienen una localización endosomal/prevacuolar (Aranda et al, no publicado). La acumulación de Na⁺ en vacuolas proporciona un mecanismo eficiente para evitar los efectos tóxicos del Na⁺ en el citosol, mientras que la acumulación de K⁺ en vacuolas o compartimentos endosomales, así como la regulación del pH intracelular son esenciales para varios procesos celulares que se pueden ver afectados por el estrés salino. Cellier y colaboradores (2004) sugirieron que al menos un miembro de familia CPA2, AtCHX17, puede contribuir a la adquisición de K⁺ y a su homeostasis bajo condiciones salinas, ya que los niveles de transcrito de este gen aumentan en dichas condiciones (Maathuis 2006). En mutantes *chx17* no se observaron diferencias en el contenido de Na⁺, pero sí una disminución en el contenido de K⁺ con respecto a plantas silvestres cuando se cultivaron ambas en condiciones salinas (Cellier et al 2004). Estos estudios sugieren que CHX17 transporta más K⁺ que Na⁺ y que este transportador podría participar en la homeostasis de K⁺ en raíces, particularmente durante el estrés salino. Igualmente se ha demostrado que el transportador AtCHX20

complementa la sensibilidad a la deficiencia de K^+ a pH alcalino provocada por la disrupción del transportador intracelular SckHA1 en levadura. En *Arabidopsis*, AtCHX20 estaría implicado en la osmoregulación a través del transporte de K^+ 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 está localizado en cloroplastos, estando 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. Se ha observado que los mutantes *chx23*, además de tener un desarrollo anormal de los cloroplastos y un pH citosólico más alto, muestran una alta sensibilidad a NaCl (Song y col 2007).

Se ha sugerido que los principales antiportadores implicados en la acumulación de Na^+ en vacuolas son las proteínas de la familia NHX (Blumwald et al 2007). Sin embargo, se ha demostrado también que al menos algunos miembros de esta familia tienen una localización endosomal, y catalizan un intercambio (Na^+,K^+)/ H^+ o K^+ / H^+ (Venema et al 2002, Venema et al 2003), mientras que otros están claramente implicados en la regulación del pH vacuolar (Fukada-Tanaka et al 2000).

6. Transportadores NHX

El primer miembro de la familia NHX identificado en plantas fue AtNHX1 (Gaxiola et al 1999), que mostró homología con los antiportadores Na^+/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 y colaboradores (2005) propusieron la agrupación de las proteínas NHE6 y NHE7 humanas, ScNHX de levadura y AtNHX1 de *Arabidopsis* en una nueva subfamilia NHE de antiportadores Na^+/H^+ intracelulares. Posteriormente, se han identificado muchos más antiportadores intracelulares, ahora llamados NHX, en plantas, hongos y animales.

6.1. Análisis filogenético.

Como ya se ha mencionado, de acuerdo a la clasificación de Saier y colaboradores (1999 [http:// www.tcdb.org/index.php](http://www.tcdb.org/index.php)), los transportadores NHX se incluyen en la familia CPA1 que tiene su origen en los genes NhaP de procariotas (Fig A6, Brett et al 2005). Los genes NhaP presentan una alta homología de secuencia con antiportadores de membrana plasmática del tipo AtSOS1 (*SOS-like*), que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Los transportadores más estudiados en la familia CPA1 son las proteínas

NHE presentes sólo en animales y localizadas en la membrana plasmática. Además, se han identificado proteínas NHE/NHX intracelulares en plantas, animales y hongos. Estas proteínas constituyen un grupo muy diverso, denominado NHX, subdividido a su vez en Clase-I y Clase-II (Pardo et al 2006), con aproximadamente 20 a 25 % de identidad entre ellas (Brett et al 2005).

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. Las secuencias más estrechamente relacionadas con las secuencias de Clase I no pertenecientes a células vegetales se pueden encontrar en parásitos primitivos de eucariotas como *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*, aunque estas proteínas podrían representar isoformas que circulan entre la membrana plasmática y membranas internas, como se ha sugerido para la proteína DdNHE1 de la familia NHE-8 de *Dictyostelium discoideum* (Patel y Barber 2005).

Las secuencias de Clase-II de plantas constituyen una subclase separada dentro de las secuencias Clase-II, la cual incluye los

transportadores ScNHX1, HsNHE6 y HsNHE7. 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 (Fig A6 Tabla A2).

Tabla A2. (pag sig.) Números de accesoión (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) y longitud de las proteínas mostradas en la figura A6. Las abreviaturas utilizadas corresponden a las siguientes especies: Vv, *Vibrio vulnificus*; Dd, *Dictyostelium discoideum*; Eh, *Entamoeba Histolytica*; Ed, *Entamoeba dispar* SAW760; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Ac, *Aspergillus clavatus*; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Ol, *Ostreococcus lucimarinus*; Ot, *Ostreococcus tauri*; Pp, *Physcomitrella patens*; Ps, *Picea sitchensis*; Pt, *Pinus taeda*; Zm, *Zea mays*; Os, *Oryza sativa*; Ta, *Triticum aestivum*; At, *Arabidopsis thaliana*; Sl y Le, *Solanum lycopersicon*; Nv, *Nematostella vectensis*; Tah, *Trichoplax adhaerens*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Ag, *Anopheles gambiae*; Mm, *Mus musculus*; Hs, *Homo sapiens*. La numeración de las secuencias corresponde a datos publicados. Los números que figuran entre paréntesis han sido asignados para distinguir entre sí las secuencias tomadas de las bases de datos.

* : Anotado como secuencias parciales

** : Número de accesoión para secuencia EST

		Length (AA)			Length (AA)
Bacteria			Viridiplantae		
VvNhaP	Q8D8X5	831	AtNHX1	Q68K14	538
Eucaryota			AtNHX2	Q56XP4	546
Amoebozoa			AtNHX3	Q84WG1	503
DdNHE1	Q86IA5	775	AtNHX4	Q8S397	529
EhNHX(1)	Q50XA0	604	AtNHX5	Q8S396	517
Eh(NHX(2)	B0EJB5	561	AtNHX6	Q8RWU6	535
EdNHX(1)	B0E8R9	328	AtSOS1	Q9LKW9	1146
EdNHX(2)	Q50XG9	561	LeNHX1	Q93YH2	534
Fungi			LeNHX2	Q93YH1	531
ScNHX1			LeNHX3	Q1IRA3	537
AcNHX1	A1C9W3	701	LeNHX4	Q1JRA2	536
Viridiplantae			SlSOS1	Q4W3B5	1151
CrNHX(1)	A8J0T9	497	Animalia		
CrNHX(2)	A8J1K5	297	NvNHE	A7S6K9	554
CrNHX(3)	A8J5G2	589	TahNHX	B3S5H9	493*
OINHX(1)	A4RQC8	357*	CeNHX1	Q8T5S2	497*
OINHX(2)	A4S1Z7	427*	CeNHX2	Q8T5S1	644
OtNHX1	Q012P4	292	CeNHX3	Q16452	670
OISOS1	A4RRY8	1247	CeNHX4a	Q8T5R9	749
PpNHX(1)	A9SSI2	563	CeNHX4b	Q19444	684
PpNHX(2)	A9T5K8	561	CeNHX5a	Q20944	630
PpNHX(3)	A9THT5	546	CeNHX5b	Q8T5R7	611
PpNHX(4)	A9RVH1	545	CeNHX6	Q8T5R6	533*
PpNHX(5)	A9TD24	534	CeNHX7	Q21386	783
PpNHX(6)	A9SH77	479	CeNHX8a	Q8T5R4	681
PpSOS1	A9RIV6	1161	CeNHX8b	Q8T5R3	655
PsNHX	A9NW71	594	CeNHX9a	P35449	667
PtNHX	DR058123**	280*	CeNHX9b	P35449-2	667
ZmNHX1	Q84MI0	540	DmNHE1	Q8SZX8	649
ZmNHX2	Q84MH9	540	DmNHE2	Q9VIF9	1291
ZmNHX3	Q7XYX3	539	DmNHE3	Q8IPI4	751
ZmNHX4	Q7XYX2	538	DmNHE8	A2A465	576
ZmNHX5	Q7XYX1	545	AgNHE8	Q7QKG3	650
ZmNHX6	Q7XYX0	541	MmNHE8	A2A465	576
OsNHX1	Q9SXI8	535	HsNHE1	B1ALD6	815
OsNHX2	Q6UUW2	544	HsNHE2	Q9UBY0	812
OsNHX(3)	Q0J2X1	535	HsNHE3	P48764	834
OsNHX(4)	Q2R0E9	545	HsNHE4	Q6AI14	798
OsNHX(5)	Q5ZA11	528	HsNHE5	A5PKY7	896
OsNHX(6)	A2Z2G5	383	HsNHE6	Q92581	669
OsSOS1	Q5ICN3	1148	HsNHE7	Q96T83	725
TaSOS1	Q4L224	1142	HsNHE8	Q9Y2E8	577
			HsNHE9	Q8IVB4	645

6.2. Localización y expresión génica

Como ya se ha indicado, los antiportadores Clase-I de plantas investigados hasta ahora están localizados en tonoplasto. El estudio de la localización subcelular de estos transportadores se ha realizado con anticuerpos policlonales que se unen a las proteínas nativas (Apse et al 1999; Hamada et al 2001; Xia et al 2002; Fukuda et al 2004; Vasekina et al 2005; Yoshida et al 2005; Li et al 2006), mediante expresión transitoria o estable de proteínas de fusión fluorescentes en células epidérmicas de cebolla o células BY2 (Yokoi et al 2002; Ohnishi et al 2005; Yoshida et al 2005; Li et al 2006) y a través de experimentos de inmunodetección con partículas de oro (Yoshida et al 2005). La única excepción a la localización vacuolar de estos transportadores fue encontrada por Vera-Estrella y colaboradores (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*. Respecto a la localización de los antiportadores de Clase-II, en esta tesis se presentan resultados relativos a su localización. La expresión transitoria en las células epidérmicas de cebolla de proteínas de fusión fluorescentes muestra que LeNHX2 y AtNHX5 están presentes en pequeñas vesículas, lo que indica una localización prevacuolar o endosomal claramente diferenciada de las membranas de la vacuola central o del conjunto retículo endoplasmático-Golgi (Pardo et al 2006, este trabajo). La localización recuerda a la localización prevacuolar de la proteína de levadura

ScNHX1, sugiriendo así una función similar para la proteína de levadura y la de planta.

Se han encontrado varias isoformas de transportadores NHX en plantas. La mayor parte de ellas se expresan en ausencia de estrés en todos los tejidos de la planta (Quintero et al 2000; Hamada et al 2001; Fukuda et al 2004; Yokoi et al 2002; Wu et al 2004; Zhang et al 2008) y se inducen por estrés salino en hojas (Quintero et al 2000; Venema et al 2003; Kagami et al 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 2004; Zörb et al 2004). Algunas isoformas son inducidas por ABA (Yokoi et al 2002; Venema et al 2003; Li et al 2009), KCl (Fukuda et al 1999; Gaxiola et al 1999; Fukuda et al 2004; Wu et al 2004), deshidratación (Li et al 2006), estrés hiperosmótico (Fukuda et al 1999; Yokoi et al 2002; Fukuda et al 2004) o estrés por altas temperaturas (Porat et al 2002).

La expresión de las seis isoformas NHX de *Arabidopsis* se ha estudiado en detalle (Yokoi et al 2002). Las isoformas predominantes son AtNHX1 y AtNHX2, encontradas en raíces y parte aérea (Yokoi et al 2002; Shi et al 2002; Apse et al 2003). Los niveles de expresión de AtNHX3, 4 y 6 en estos tejidos eran muy inferiores a los de AtNHX1 y 2. 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 2002).

La distribución de AtNHX1 en tejidos se estudió mediante análisis de expresión del promotor Gus en plantas de *Arabidopsis* transgénicas (Shi et al 2002) y mediante hibridación *in situ* (Apse et al 2003). Estas investigaciones mostraron que AtNHX1 se expresa en todos los tejidos excepto en el ápice de la raíz. Se observaron niveles altos de expresión en células guarda, lo que sugiere un papel de AtNHX1 en la acumulación de K⁺ en estas células (Shi et al 2002). Así mismo, se detectó una alta expresión en respuesta al estrés salino no sólo en hojas, sino también en pelos radiculares, indicando un papel en la acumulación de Na⁺ en las vacuolas de estas células en respuesta al estrés salino (Shi et al 2002). También se observaron altos niveles de expresión en tejidos florales y en células estrechamente asociadas al tejido vascular en hojas e inflorescencias (Shi et al 2002; Apse et al 2003)

Algunas isoformas de genes NHX han mostrado una expresión preferencial en flores y frutos, lo que podría estar relacionado 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⁺ y la extensión de la vacuola durante la maduración (Hanana et al 2007).

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 (<http://wardlab.cbs.umn.edu/arabidopsis/> y <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Hanana et al 2007; Winter et al 2007). Como ocurre con otras isoformas específicas de *Ipomea Nil* o de uva, la expresión de AtNHX4 se ha detectado principalmente en el polen maduro y semillas. En células guarda los niveles de expresión de AtNHX1, AtNHX2, AtNHX5 y AtNHX6 son mayores que en las células del mesófilo que las rodean (<http://www.biology.ucsd.edu/labs/schroeder/index.html>; Shi et al 2002). Además, AtNHX1 y AtNHX5 se inducen por ABA en estas células, resultados que contrastan con los encontrados por Yokoi y colaboradores (2002) para AtNHX5. Se ha detectado también que varias isoformas de transportadores NHX son inducidas o reprimidas por estreses bióticos. Aunque este aspecto todavía no se ha investigado en profundidad, es posible que esta inducción/represión pudiera estar relacionada con un papel de estas proteínas en la regulación del pH citoplasmático (Viehweger 2002, Pardo et al 2006; Li et al 2009).

6.3. Propiedades bioquímicas

6.3.1. Detección de antiportadores Cation/Protón en vesículas.

La determinación de la acidificación en vesículas de membrana aisladas o vacuolas intactas ha sido fundamental para demostrar el

transporte activo primario de protones en la membrana plasmática o en el tonoplasto (Hager et al 1980; Scarborough 1980; Churchill et al 1983). Los gradientes de pH en el interior de las vesículas pueden ser monitorizados siguiendo la acumulación de bases débiles permeables como amonio o imidazol, de aminos radiactivas como [^{14}C]metilamina o aminos fluorescentes como quinacrina o naranja de acridina, que son permeables en la forma neutra, pero quedan atrapadas dentro de las vesículas en su forma protonada (Scarborough 1980). La extinción de la fluorescencia (*quenching*) de estos compuestos cuando se acumulan dentro de las vesículas ofrece una medida muy sensible de la acidificación de las mismas, aunque la cuantificación del gradiente de pH no es normalmente posible (Palmgren 1991; Clerc y Barenholz 1998). Como las bombas de H^+ de plantas son electrogénicas, la formación del gradiente de pH ácido en el interior de las vesículas de membrana también depende de la presencia de aniones permeables fuera o de cationes permeables en el interior, para facilitar el equilibrio de cargas. Por esta razón, los ensayos de determinación de la actividad transportadora se realizan normalmente en presencia de iones Cl^- , relativamente permeables, o K^+ y el ionoforo de K^+ valinomicina, facilitando el cotransporte eléctricamente acoplado de H^+ y Cl^- , o el antiporte H^+/K^+ . La monitorización del efecto de las sales sobre el establecimiento o la disipación de tales gradientes de pH ha permitido obtener indicios de la presencia de sistemas de antiporte catión/protón en las membranas de las células vegetales (Sze et al 1983; Blumwald y Poole 1985, 1987; Scherer et al 1985; Blumwald et al 2000). La velocidad de formación o disipación del gradiente de pH, sin

embargo, también depende de manera crítica de la conductividad relativa de aniones y cationes. Puesto que las vesículas de membranas aisladas son relativamente permeables a protones, es a menudo difícil distinguir entre antiportes eléctricamente acoplados y antiportadores enzimáticos catión/proton.

6.3.2. Primeras determinaciones bioquímicas de la actividad antiporte catión/protón en vesículas de membrana.

A pesar de las dificultades mencionadas en la determinación de la actividad de antiporte catión/protón, la cinética de la disipación de un gradiente de pH preestablecido en vesículas vacuolares aisladas y en vacuolas intactas de remolacha roja pudo resolverse en un componente de antiporte Na^+/H^+ electroneutro, saturable y sensible a amilorida y un antiporte eléctricamente acoplado de K^+/H^+ o Na^+/H^+ no saturable (Blumwald y Poole 1985, 1987). Posteriormente, se describió en el tonoplasto de varias especies de plantas una actividad antiporte Na^+/H^+ similar, con valores de K_m para Na^+ entre 2,4 y 51 mM (Blumwald y Poole 1985, 1987; Matoh et al 1988; Garbarino et al. 1989; Staal et al 1991; Ballesteros et al 1997; Fukada et al 1999). Esta actividad se inducía rápidamente en plantas que crecían en condiciones salinas, sobre todo en especies glicófitas (Garbarino et al 1989).

Se han obtenido evidencias de la existencia de actividad antiporte K^+/H^+ estudiando los efectos de diferentes sales sobre la formación o la disipación de gradientes de protones en membrana plasmática de callos de

tabaco (Sze et al 1983), tonoplasto y membrana plasmática de raíces de algodón y de *Atriplex* (Hassidim et al 1990) e hipocotilos de calabacín (Scherer et al 1985). El antiporte K^+/H^+ parece ser mucho menos selectivo para K^+ , pues exhibe una actividad considerable con otros cationes monovalentes.

6.3.3. Medida de la actividad de las proteínas de la familia de antiportadores NHX

Ninguna de las aproximaciones bioquímicas ha permitido la identificación de las proteínas responsables de la actividad antiportadora K^+ , Na^+/H^+ . Una vez secuenciado el genoma de *Arabidopsis*, la situación se ha revelado mucho más compleja que la esperada inicialmente, ya que se han identificado un total de 44 secuencias con homología a antiportadores Na^+/H^+ o K^+/H^+ en esta planta modelo. Estos transportadores se localizan en tonoplasto, membrana plasmática o membranas endosomales (Sze et al 2004).

La homología de secuencias de AtNHX1 con las de los antiportadores NHE sugiere que AtNHX1 es la proteína responsable del antiporte específico Na^+/H^+ inducido por estrés salino y sensible a amilorida encontrado en vesículas del tonoplasto de *Arabidopsis* (Apse et al 1999). La actividad antiporte Na^+/H^+ de AtNHX1, ensayada en membranas vacuolares obtenidas de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan este transportador, muestra una K_m de 7 mM para Na^+ , mientras que en plantas silvestres no transformadas esta actividad era muy baja. La disrupción de AtNHX1 causa una disminución de la actividad de intercambio Na^+/H^+ (Apse et al 2003). Aunque inicialmente se consideró que AtNHX1 era un transportador

específico para Na^+ , estudios posteriores han mostrado que también cataliza el antiporte K^+/H^+ , aunque con afinidad más baja (Apse et al 1999; Zhang et al 2001; Venema et al 2002; Apse et al 2003). El hecho de que mutantes carentes de AtNHX1 o líneas que sobreexpresan el gen tengan alterada la actividad antiportadora total de manera considerable, indica que AtNHX1 es el principal contribuyente a la actividad de antiporte Na^+/H^+ o K^+/H^+ vacuolar, a pesar de la presencia en *Arabidopsis* de otras cinco isoformas NHX así como de otras proteínas de las familias CPA1 y CPA2.

Para poder evaluar de una forma más detallada la función de los antiportadores NHX de plantas, evitando interferencias con otros antiportadores, un sistema adecuado es la expresión heteróloga en levadura. De esta forma se ha podido medir la actividad AtNHX1 en vesículas de membrana vacuolar obtenidas a partir de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en la cual el gen ScNHX, isoforma endógena de NHX, era inactivado (Darley et al 2000). La actividad de AtNHX1 parece ser ligeramente más alta que la de la proteína endógena de levadura, con valores de K_m de 11 y 16 mM para el Na^+ , respectivamente. Esta actividad es electroneutra, como se concluye de experimentos con la sonda de potencial de membrana Oxonol V, y sensible a amilorida. Utilizando una cepa de levadura similar, Yamaguchi y colaboradores (2003) encontraron que la actividad antiporte K^+/H^+ era aproximadamente dos veces más alta que la actividad antiporte Na^+/H^+ en vesículas vacuolares obtenidas a partir de levadura que sobreexpresa la proteína AtNHX1, siendo los valores de K_m para K^+ y Na^+ 12 y 24 mM, respectivamente. Las discrepancias entre las determinaciones en plantas y en

levaduras podrían ser debidas a la existencia de mecanismos reguladores específicos de plantas que no están presentes en el sistema heterólogo. En este sentido, se encontró que la eliminación del dominio C-terminal de AtNHX1 aumenta la actividad antiporte Na^+/H^+ , mientras que la unión de la proteína AtCaM15 tiene el efecto opuesto (Yamaguchi et al 2003, 2005). Se ha propuesto que en condiciones normales AtNHX1 funciona en la acumulación vacuolar de K^+ , mientras que en condiciones de estrés salino se podría activar el intercambio Na^+/H^+ de este transportador, liberándose del bloqueo por otras proteínas como CaM15 unidas al dominio C-terminal. La sobreexpresión de AtNHX1 también induciría principalmente el antiporte Na^+/H^+ debido a la ausencia de suficiente cantidad de proteínas inhibitorias. En la levadura, la enzima estaría presente en el modo antiporte K^+/H^+ . Sin embargo, las diferencias en los niveles de expresión en levadura de las proteínas desprovistas o no del extremo C-terminal podrían afectar a los resultados (Yamaguchi et al 2003). También se ha constatado que el responsable principal de la actividad de antiporte Na^+/H^+ y K^+/H^+ en las vesículas vacuolares de levadura es la proteína Vnx1, una proteína con homología a antiportadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ y $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (Cagnac et al 2007), lo que lleva a reconsiderar las primeras descripciones de la actividad antiporte Na^+/H^+ atribuidas a AtNHX1 en levadura, pues parte de ella podría estar asociada a Vnx1. Finalmente, se ha demostrado que ScNHX1 participa en el tráfico de vesículas y direccionamiento de proteínas en el sistema endosomal y en la biogénesis prevacuolar/vacuolar (Bowers et al 2000; Brett et al 2005), lo que complica la obtención de preparaciones de membrana vacuolar que

sean comparables entre levaduras de tipo salvaje y mutantes que no expresan ScNHX1.

Por todo ello, las vesículas de membrana o vacuolas intactas en las que operan muchos transportadores de iones no son el sistema más adecuado para estudiar la función de antiportadores NHX de plantas. La expresión heteróloga en levaduras facilita la purificación de proteínas usando las etiquetas de afinidad adecuadas. Para evitar la interferencia con otros transportadores iónicos, la proteína purificada puede ser reconstituida en liposomas artificiales. Finalmente, la encapsulación de indicadores de pH impermeables dentro de los proteoliposomas durante la reconstitución, permite una verdadera medida cuantitativa de pH dentro del rango de sensibilidad del indicador. Usando esta aproximación se demostró que la proteína AtNHX1 cataliza el antiporte Na^+/H^+ y K^+/H^+ con una afinidad similar de aproximadamente 40 mM (Venema et al 2002). Este antiporte podía ser inhibido por los análogos de amilorida, EIPA (5-(N-etil-N-isopropil)amilorida) y benzamil.

El único transportador de la familia NHX de Clase-II de plantas que ha sido estudiado y para el cual se han realizado medidas de actividad es la proteína de tomate LeNHX2. Se ha demostrado que esta proteína, purificada y reconstituida en liposomas, cataliza de forma específica el antiporte K^+/H^+ (Venema et al 2003, este trabajo), coincidiendo con los resultados de estudios de acumulación de iones en levaduras que expresan este transportador (Venema et al 2003).

Las medidas de actividad en otras isoformas de genes NHX son escasas. La actividad del antiportador de Clase-I VvNHX1 de uva, ensayada en vesículas vacuolares de levadura, muestra afinidad similar para K^+ y Na^+ (Hanana et al 2007). La sobreexpresión de AtNHX3 en remolacha tolerante a sal incrementa sobre todo el antiporte K^+/H^+ en vesículas de tonoplasto, acumulando estas plantas transgénicas más K^+ (Liu et al 2008). La proteína NHE8 humana, un antiportador similar al clado de antiportadores vacuolares de plantas, una vez purificada y reconstituida en liposomas, muestra actividad antiporte K^+/H^+ y, en menor grado, Na^+/H^+ (Nakamura et al 2005). Asimismo, la isoforma NHE8 de mosquito cataliza el antiporte Na^+/H^+ , K^+/H^+ y Li^+/H^+ en vesículas reconstituidas. Cuando NHE8 se expresa en fibroblastos deficientes en NHE se observa que la toma de $^{22}Na^+$ por estas células es sensible a amilorida (Kangethe et al 2007). La inhibición de la entrada de Rb^+ en compartimentos endosomales por K^+ , Na^+ o Li^+ , indica una actividad antiporte K^+/H^+ y, en menor medida, Na^+/H^+ y Li^+/H^+ para la proteína humana NHE7 (Numata 2001). En levadura en la que la membrana plasmática está permeabilizada se observa un rápido eflujo de $^{22}Na^{+72}$ o $^{86}Rb^{+68}$ en las cepas que carecen de ScNHX1, mientras que en las cepas de tipo silvestre estos iones permanecen en las vacuolas, indicando ello que la proteína ScNHX1 también cataliza el intercambio Na^+/H^+ y K^+/H^+ . Se puede concluir que la familia de proteínas NHX intracelulares catalizan un antiporte K^+/H^+ y Na^+/H^+ relativamente no-específico.

6.4. Organización estructural y propiedades reguladoras

Los análisis topológicos y estudios de función sólo se han realizado hasta ahora para la proteína AtNHX1. El análisis de la hidropatía de NHX indica una organización de dominios similar a las isoformas NHE, lo que sugiere que los rasgos estructurales se han conservado. En el dominio conservado N-terminal hay 12 regiones hidrófobas que potencialmente constituyen hélices transmembrana, mientras que el dominio C-terminal hidrofílico estaría implicado en interacciones reguladoras. Hasta el momento se han propuesto dos modelos topológicos diferentes (Yamaguchi et al 2003; Sato et al 2005). Experimentos detallados de traducción *in vitro* indican que la topología de AtNHX1 es muy similar a la de la proteína NHE1 humana (Wakabayashi et al 2000; Sato et al 2005), con 11 hélices transmembrana y un bucle intramembrana correspondiente a la región hidrófoba 9. Las isoformas NHX de plantas, contrariamente a las isoformas intracelulares presentes en otros organismos, carecen de la primera extensión H1 hidrófoba que, en NHE1 o en NHE6, actúa como un péptido señal N-terminal necesario para la inserción en el retículo endoplasmático (Sato et al 2005). Aún así, la primera hélice transmembrana de AtNHX1, correspondiente a la hélice transmembrana 2 de NHE1, se inserta en la misma orientación en la membrana, mientras el extremo C-terminal está en el citoplasma (Sato et al 2005). La región hidrófoba 9 tiene una topología muy similar al bucle H10

característico de la isoforma NHE1 humana, y no atravesaría la membrana completamente (Wakabayashi et al 2000; Sato et al 2005). La mutagénesis en la región correspondiente de la proteína ScNHX1 de levadura ha revelado que varios aminoácidos que únicamente están conservados entre los NHX intracelulares son esenciales para su función (Mukerjee et al 2006) (Fig. A7). Sin embargo, un modelo en tres dimensiones de NHE1 basado en la estructura cristalina de NhaA predice una estructura diferente, en particular en lo referente a la hélice 9 transmembrana y al bucle intramembranario H10 de NHE1 (Landau et al 2007).

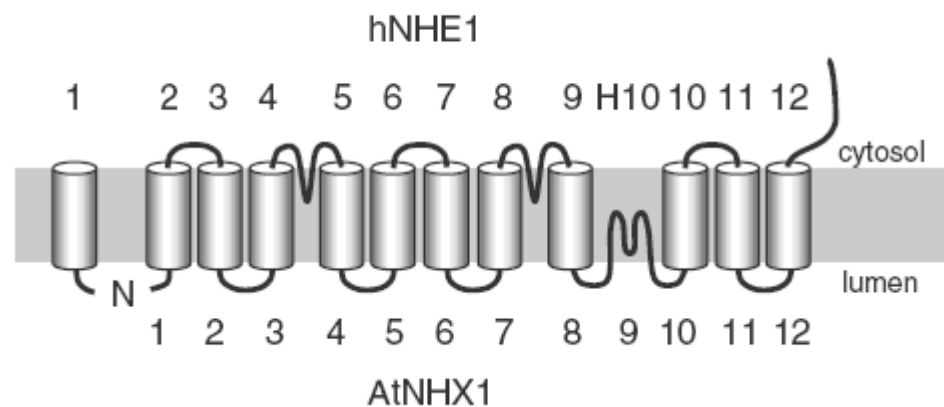


Fig A7. Modelo de la topología de AtNHX1 (Sato et al 2005).

Estudios en mutantes insercionales con un epítipo 3xHA han llevado a proponer una topología de membrana diferente para la proteína AtNHX1 de *Arabidopsis* (Yamaguchi et al 2003). En este modelo el dominio C-terminal estaría expuesto al lumen vacuolar, mientras el dominio N-terminal podría ser citoplasmático. Conforme con esta topología, se ha descrito que algunos

aminoácidos del dominio C-terminal de la proteína ScNHX1 están N-glicosilados, lo que indica que al menos parte del dominio C-terminal está expuesto al lumen endosomal en alguna etapa (Wells et al 2001). Este nuevo modelo referente a la topología de AtNHX1 predice la existencia de sólo 9 hélices transmembrana. En este modelo, el dominio hidrófobo 3 que contiene el lugar de unión a amilorida y los dominios hidrófobos 5 y 6, que contienen residuos probablemente implicados en la unión y en el transporte de Na^+ o H^+ , no atraviesan la membrana. Ello implicaría que varias de las hélices transmembrana de AtNHX1 están insertadas en la membrana en dirección opuesta a la de inserción de las hélices transmembrana de proteínas NHE de la membrana plasmática, lo que ha sido relacionado con el hecho de que las proteínas NHXs de plantas muestren una dirección de transporte opuesta a la de las proteínas NHE de la membrana plasmática (Yamaguchi et al 2003) (Fig A8).

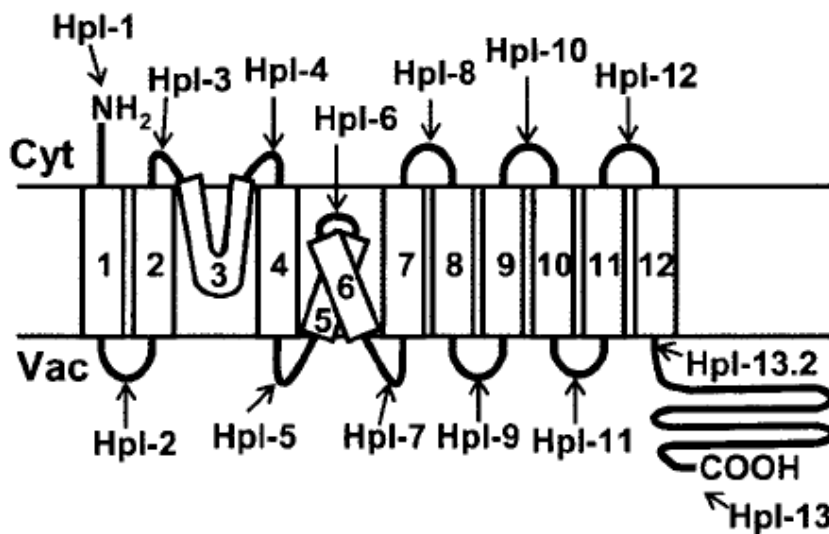


Fig. A8. Modelo sobre la estructura de AtNHX1 (Yamaguchi et al 2003)

Mientras las proteínas NHE de la membrana plasmática de células animales son activadas por acidificación citoplasmática y normalmente catalizan la entrada de Na^+ acoplada a la extrusión de protones (Landau et al 2007), las enzimas de las plantas están implicadas en la extrusión a la vacuola de Na^+ o K^+ , causando acidificación citoplasmática. La proteína bacteriana relacionada, NhaA ($2\text{H}^+/\text{Na}^+$), se activa por alcalinización interna y cataliza la entrada de protones acoplada a la extrusión de Na^+ (Taglicht et al 1991). Los intercambiadores electroneutros catión/protón 1:1 podrían ser completamente reversibles, como se ha demostrado para el intercambio Na^+/H^+ sensible a amilorida de células de mamíferos (Paris y Pouysségur 1983) y para el antiportador Na^+/H^+ SOD2 de membrana plasmática de *Schizosaccharomyces pombe* (Hahnenberger et al 1996). Estudios de mutagénesis en la proteína humana NHE1 y análisis estructurales de sus hélices transmembrana han señalado la existencia de algunos residuos localizados en los segmentos transmembrana 4, 7 y 9 (correspondientes a 3, 6 y 8 en AtNHX1 de *Arabidopsis*) que podrían estar directamente implicados en el transporte de iones (Reddy et al 2008). Estas regiones transmembrana están fuertemente conservadas también en la familia de transportadores intracelulares NHX. Se ha propuesto un mecanismo que explica cómo las proteínas NHE llevan a cabo el transporte de iones tomando para ello como base los datos obtenidos de estos estudios de mutagénesis, así como el modelo de NHE basado en la estructura del antiportador bacteriano NhaA (Landau et al 2007). Este modelo señala como esenciales los aminoácidos

P167, P168, E262, D267 y S351, que correspondería a los aminoácidos P88, P89, E179, D185 y S271 del transportador AtNHX1 de *Arabidopsis*, y que están conservados en todas las proteínas de la familia de transportadores NHX intracelulares. La mayor parte los residuos de NHE que son importantes para la unión de fármacos o su actividad están conservados en las secuencias NHX. Todo ello indica que la estructura y el funcionamiento de los transportadores de las familias NHX y NHE es muy similar y que la dirección de transporte es impuesta por dominios reguladores.

La actividad de proteínas NHE de células animales puede ser regulada por una variedad de mecanismos que implican a la larga cola C-terminal. Se ha indicado que la eliminación de los 82 últimos aminoácidos de la proteína AtNHX1 modifica la especificidad de transporte, incrementando especialmente la actividad antiporte Na^+/H^+ , pero no la actividad antiporte K^+/H^+ , lo que apunta un posible papel regulador de este dominio (Yamaguchi et al 2003). Posteriormente se ha demostrado, usando un sistema de dos híbridos y ensayos de inmunoprecipitación, que el dominio C-terminal interacciona con una proteína CAM-like, AtCaM15 (Yamaguchi et al 2005). AtCaM15 se localiza en vacuolas de protoplastos de *Arabidopsis* transformados transitoriamente y en vacuolas de células de levadura que expresan la proteína. Esta localización permitiría su interacción con el dominio C-terminal de AtNHX1 en el interior de las vacuolas. Medidas de actividad usando vacuolas de levaduras obtenidas de células que expresan AtNHX1 y AtCaM15 indicaron que la unión de CaM15 inhibía el antiporte Na^+/H^+ de AtNHX1, sin un efecto significativo sobre la K_m de la reacción de

transporte, siendo la inhibición de la actividad de antiporte K^+/H^+ menos pronunciada, resultando en una mayor especificidad para K^+ .

La actividad AtNHX1 está también posiblemente regulada por interacción con la proteína kinasa SOS2 (Qiu et al 2004). Como ya se ha indicado en esta memoria, SOS2 es una kinasa de la ruta SOS (*Salt Overly Sensitive*) implicada en la regulación del transporte de iones bajo estrés salino y en la regulación de otras respuestas a estrés (Batelli et al 2007). La actividad vacuolar de antiporte Na^+/H^+ sensible a amilorida en vesículas de membrana de *Arabidopsis* es más baja en mutantes *knockout sos2*, siendo estimulada *in vitro* por adición de proteína SOS2 activada (Qiu et al 2004) e inhibida por anticuerpos anti-AtNHX1. Mediante *tandem affinity purification* y utilizando un sistema de doble híbrido en levadura se ha observado que SOS2 interacciona también con varias subunidades de V-ATPasa y que vesículas aisladas de mutantes *knockout sos2* muestran una considerable disminución en la acidificación dependiente de V-ATPasa (Batelli et al 2007). Por ello, la comparación de la actividad antiporte en vesículas obtenidas de plantas silvestres y mutantes *sos2* es difícil, pues la actividad V-ATPasa responsable de la acidificación de la vesícula y determinante de la fuerza motriz necesaria para el antiporte no es la misma en los dos casos.

No se han estudiado aún los mecanismos estructurales o reguladores de otras isoformas de NHX de plantas. El extremo C-terminal de la proteína NHX1 de levadura interacciona con la proteína Gyp6, activadora de GTPasa (Ali et al 2004). Se ha propuesto un modelo según el cual Gyp6 funciona como un regulador negativo de NHX, afectando al pH endosomal y al tráfico

retrogrado y anterógrado entre los compartimentos prevacuolares y el Golgi (Alie et al 2004). El extremo C-terminal de la proteína NHE7 humana localizada en la región trans-Golgi interacciona con varias proteínas SCAMP (*Secretory Carrier Membrane Protein*) que podrían afectar al transporte de NHE7 entre *recycling endosomes* y la red trans-Golgi (Lin et al 2005). La región C-terminal de la isoforma NHE7 también interacciona con caveolinas, facilitando la asociación de NHE7 a caveolas/*lipid rafts* (Lin et al 2007). El dominio C-terminal de las isoformas humanas NHE6, 7 y 9, pero no el de NHE8, interacciona con el receptor RACK1 (*Receptor for Activated C Kinase 1*). Se ha sugerido que esta interacción es importante para el mantenimiento del pH luminal de compartimentos endocíticos y para la distribución de NHE6 entre los endosomas y la membrana plasmática (Ohgaki et al 2008). También se ha demostrado que NHE6 de rata interacciona con proteína G acoplada al receptor At-2 (Pulakat et al 2005).

6.5. Función de antiportadores NHX

6.5.1. 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 halófila que crece a 400 mM NaCl, con la especie glicofita relacionada

Medicago intertexta, se encontró que la especie halofítica acumulaba mucho menos Na^+ y mantenía niveles más altos de K^+ que la glicofita cuando ambas se cultivaban en condiciones salinas. La acumulación de Na^+ 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^+ 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^+ 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, monocotiledonea 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^+ 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.

Estudios preliminares han mostrado que mutantes 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, las propiedades reguladoras y la localización celular de las enzimas puede resultar alterada bajo condiciones de fuerte sobreexpresión (Yamaguchi et al 2003; Yamaguchi et al 2005). Sólo Yang y colaboradores (2009) han afirmado 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 otra isoforma NHX 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 2006; 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). 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 expresión los antiportadores en especies sensibles o tolerantes.

El aumento de la tolerancia a la salinidad no siempre está acompañado de un aumento en la acumulación vacuolar de Na⁺, y pueden darse 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 2004; Li et al 2007) o K⁺ más alto y Na⁺ más bajo (Kang'ethe et al 2007; Zhang et al 2008). Como las

proteínas NHX también transportan K^+ , es evidente que las concentraciones de este ión se ven afectadas en plantas sobrepresoras de genes NHX, especialmente en el caso de los antiportadores de Clase-II, con alta especificidad para el K^+ . La disminución del contenido en Na^+ podría ser el resultado de mecanismos secundarios inducidos por la mejora en la homeostasis de K^+ . En algunos casos se ha observado que plantas transgénicas que sobreexpresan NHX tienen también un potencial hídrico más bajo en la hoja, lo que permitiría mayor toma de agua en condiciones salinas o de sequía (Lohaus et al 2000).

En levadura, la interrupción de ScNHX1 o la sobreexpresión de antiportadores de plantas también provocan cambios en las concentraciones de Na^+ y K^+ intracelulares. Especialmente en levaduras en las cuales el principal sistema de eflujo de Na^+ , ENA, está interrumpido, se acumulan grandes cantidades de Na^+ en respuesta al estrés salino, a costa del K^+ interno (Gaxiola et al 1999). La interrupción de ScNHX1 tiene algún efecto sobre el contenido de Na^+ interno, pero sobre todo causa una disminución del K^+ interno (Quintero et 2000; Venema et al 2003). En células de levadura con ENA y ScNHX1 interrumpidos, la sobreexpresión de AtNHX1 o AtNHX2 aumenta fuertemente la concentración de K^+ y Na^+ intracelular cuando la levadura se cultiva en presencia de NaCl (Yokoi et al 2002). La sobreexpresión de los antiportadores de Clase-II AtNHX5 y LeNHX2 aumenta el K^+ , pero reduce el Na^+ intracelular (Yokoi et al 2002; Venema et al 2003). En el caso del antiportador de tomate, el K^+ se acumula en compartimentos intracelulares (Venema et al 2003). También Gaxiola et al

(1999) mostraron que ScNHX1 principalmente afecta a la acumulación intracelular de K^+ . Estos autores observaron que la expresión en levadura de H^+ pirofosfatasa de plantas, que tendría como efecto un incremento del gradiente de pH en vacuola y por ende un aumento en la fuerza motriz para la acumulación de cationes, tiene como consecuencia un incremento de los niveles intracelulares de K^+ acompañado de un incremento en la tolerancia a la salinidad y una reducción del contenido en Na^+ . Estos fenotipos se anulan en una cepa de levadura sin el gen endogeno ScNHX1 (Gaxiola et al 1999).

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 estas observaciones 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 alta concentraciones de KCl y al estrés hiperosmótico

en células de levadura confirma este papel (Gaxiola et al 1999; Nass et al 1999; Fukuda et al 2004).

6.5.2. Homeostasis de K.

Además de un papel en el ajuste osmótico por participar en la acumulación de Na^+ o K^+ en condiciones de estrés salino, se sugirió que las proteínas NHX intervienen en la homeostasis de K^+ en condiciones normales de crecimiento (Zhang y Blumwald 2001; Venema et al 2002). La mayor parte del K^+ celular está presente en la vacuola donde está implicado en el mantenimiento del turgor y en la expansión celular, mientras que el K^+ citoplasmático tiene funciones tanto osmóticas como bioquímicas. El K^+ 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^+ 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^+ de alta afinidad, o el eflujo de K^+ 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^+/H^+ para la acumulación de K^+ . Termodinámicamente, la entrada activa de K^+ en la vacuola en condiciones de suficiencia de K^+ puede ser mediada por un antiportador K^+/H^+ , pero el eflujo activo requiere un sistema de simporte K^+/H^+ (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). La sobreexpresión de AtNHX1 en tomate provoca síntomas de deficiencia a pesar del aumento de la toma y del contenido de K^+ (Leidi et al 2005; Pardo et al 2006). En este caso, la disminución de la concentración de K^+ citosólico podría provocar una señal de carencia de K^+ que conduciría a un aumento de la toma del catión (Pardo et al 2006). Los mutantes de *Arabidopsis* que no expresan NHX1 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 potasio 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

90

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 PM-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).

6.5.3. Regulación de 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 et al 1998). Distintos tipos de estrés, 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 et al 1998; Roos et al 2000; Netting et al 2002; Viehweger et al 2002; Zhao et al 2005).

La participación de 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).

Aunque la participación de los transportadores NHX de plantas en la regulación del pH citoplasmático aún no ha sido demostrada, se sabe que la acidificación citoplasmática inducida por elicitores y necesaria para disparar el *oxidative burst* y la síntesis de metabolitos secundarios depende de la estimulación por lisofosfatidilcolina de una actividad antiporte sensible a amilorida en tonoplasto (Viehweger et al 2002).

En levadura se ha demostrado claramente la participación de ScNHX1 en la regulación del pH. Las células que no expresan ScNHX son sensibles al pH ácido y tienen un pH vacuolar y citoplasmático más ácido (Brett et al 2005). La función más importante de la proteína ScNHX1 de levadura está relacionada con su participación en la regulación del pH endosomal. El gen ScNHX1 es idéntico al gen de VPS44, implicado en el *Vacuolar Protein Sorting*

(Bowers et al 2000) y su disrupción causa secreción de CPY (*CarboxyPeptidase Y*), alargamiento de endosomas y acumulación en endosomas de proteína G acoplada al receptor Ste3 o del colorante FM4-64, que en células de la cepa silvestre se dirigen a la vacuola (Bowers et al 2000; Brett et al 2005). La disrupción de ScNHX1 también causa fuerte sensibilidad a higromicina B (Gaxiola et al 1999), un fenotipo compartido por muchos otros mutantes VPS, indicando que el fenotipo está relacionado con una biogénesis defectuosa de las vacuolas, que representarían el lugar para la detoxificación de higromicina B (Bowers et al 2000; Mukerjee et al 2006). La adición de bases débiles puede suprimir estos fenotipos en mutantes que no expresan NHX1, lo que demuestra que la alcalinización endosomal por ScNHX1 es esencial para el tráfico vesicular de endosomas a vacuola (Mukerjee et al 2006). El papel de NHX en la regulación del pH probablemente depende más del K^+ que del Na^+ , menos relevante fisiológicamente. En este sentido, la actividad de intercambio K^+/H^+ parece ser un rasgo universal de los transportadores NHX intracelulares (Brett et al 2005; Mukerjee et al 2006).

Las isoformas de genes NHX de plantas tanto de la Clase-I como de la Clase-II complementan la sensibilidad a NaCl, KCl e higromicina de los mutantes de levadura con disrupción en ScNHX1 (Quintero et al 2000; Yokoi et al 2002; Venema et al 2003). Esto sugiere un papel para las proteínas NHX de plantas en la regulación del pH endosomal y en el tráfico de proteínas. El efecto de la expresión de genes NHX de plantas en levaduras sobre el tráfico de proteínas no ha sido estudiado. Sin embargo, se sabe que las plantas que sobreexpresan la proteína del tráfico intracelular de vesículas AtRab7,

implicada en la biogénesis vacuolar, presentan mayor resistencia a estreses salino y osmótico y acumulan mayor cantidad de Na^+ en la vacuola (Mazel et 2004). Además, se ha demostrado que la supresión de la expresión de proteínas v-SNARE incrementa la tolerancia a sal, presumiblemente por la inhibición de la fusión a la vacuola de endosomas productores de especies reactivas de oxígeno (Leshem et al 2006). La regulación del tráfico de vesículas por proteínas NHX de plantas podría representar un mecanismo alternativo o adicional implicado en la tolerancia a la salinidad. Las secuencias de Clase-II de plantas, más estrechamente relacionadas con proteínas NHX de otros organismos implicadas en el tráfico de vesículas, catalizan intercambios K^+/H^+ más específicos y muestran un patrón de expresión subcelular similar a la proteína ScNHX1 de levadura, lo que las convierte en candidatas para estas funciones en plantas. Los antiportes de Clase-I también podrían desempeñar un papel en el tráfico intracelular de vesículas, así el análisis de la expresión génica por array de ADN en un mutante obtenido por inserción de T-DNA en AtNHX1 mostraba cambios en la expresión de un gran número de genes que codifican proteínas asociadas con el tráfico intravesicular, el tráfico al núcleo y el procesamiento en el Aparato de Golgi (Sottosanto et al 2004).

Materiales y Metodos

1. Material biológico

1.1. Bacterias

1.1.1. Cepas utilizadas

En este trabajo se utilizaron las cepas NovaBlue y Mach1TMT1 de *Escherichia coli* para la amplificación y multiplicación de los plásmidos (Tabla M1).

Tabla M1. Características de las cepas de *E. coli* utilizadas

Cepa	Genotipo	Procedencia
NovaBlue	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1lac [F' proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15::Tn10 (Tc^r)]</i>	Novagen
Mach1 TM T1 ^R	ΔrecA1398 endA1 tonA Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(r _K ⁺)	Invitrogen

Para la transformación de plantas se usaron dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (Tabla M2), la cepa LBA4404 para la transformación de tomate y la GV3101 para la transformación de *Arabidopsis thaliana*.

Tabla M2. Características de las cepas de *A. tumefaciens* utilizadas.

Cepa	Fondo Cromosómico/ Resistencia	Plásmido Ti/Gen Marcador ^c	Opina ^B
LBA4404	TiAch5 / Resistencia a rifampicina	pAL4404/ espectinomomicina y estreptomomicina	Octopina
GV3101	C58C1/ Resistencia a rifampicina	Pmp90RK/ Geneticina y Kanamicina	Nopalina

1.1.2. 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 M3). 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: Ampicilina (100 µg/ml), Kanamicina (50 µg/ml), Rifampicina (50 µg/ml), Espectinomomicina (50 µg/ml) y Estreptomomicina (50 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 por filtración a través de filtros de 0,45 µm (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.

Tabla M3. Medios utilizados para el cultivo de bacterias

Medio	Composición	Utilidad
LB	Bacto-triptona 1% (p/v) NaCl 1% (p/v) Extracto de levadura 0,5% (p/v) pH 7,0 con NaOH	Cultivo de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>
SOB	Bacto-triptona 2% (p/v) Extracto de levadura 0,5% (p/v) NaCl 10 mM KCl 25 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM pH 6,7-7,0 con NaOH	Cultivo de <i>E. coli</i> para obtención de células competentes
SOC	Bacto-triptona 2% (p/v) Extracto de levadura 0,5% (p/v) NaCl 10 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucosa (2%)	Cultivo de <i>E. coli</i> tras la transformación
TYNG	Bacto-triptona 1% (p/v) Extracto de levadura 0,5% (p/v) NaCl 170 mM MgSO ₄ · 7 H ₂ O 0,8 mM pH 7,5 con NaOH	Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Para cultivar las bacterias en medio líquido, se inoculó una colonia procedente de un cultivo previo en 3 ml de medio o se inoculó en medio fresco a una dilución 1/250 un cultivo madre saturado. El cultivo de *E. coli* se

incubó durante 16 horas (cepa Novagen) o 5 horas (cepa Mach T1) a 37 °C y el de *Agrobacterium tumefaciens* a 28 °C durante 2 días.

1.1.3. Obtención de células competentes.

Las células competentes de *E. coli* se prepararon según el método descrito por Inoue y colaboradores (1990). Se inoculó 125 µl de un cultivo saturado de *E. coli* en 250 ml de medio SOB (Tabla M3), incubándose a 18-25 °C y 250 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6, medida a 600 nm. El cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó a 2500 g durante 10 minutos, a 4 °C. Al sedimento se añadió 80 ml de tampón de transformación frío (100 mM PIPES, 250 mM KCl, 15 mM CaCl₂·2H₂O, 55 mM MnCl₂·4H₂O, pH 6,70 con KOH) y se incubó en hielo 10 minutos. Después de otra centrifugación a 2500g durante 10 min se añadió al sedimento resultante 20 ml de tampón de transformación frío y DMSO hasta una concentración final del 7 %. Se separaron alícuotas de 200 µl que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

1.1.4. Transformación de *E. coli*

Se partió de una alícuota de 200 µl de células competentes congeladas a las que se adicionó entre 1 y 4 µl de plásmido (1-10 ng) o mezcla de ligación. Las células se incubaron en hielo durante 20 minutos y luego se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 1,5 minutos. Seguidamente, se enfriaron en hielo durante 2 minutos y se añadió 1 ml de medio SOC (Tabla M3), incubándose el conjunto a 37 °C en agitación durante

al menos una hora. Transcurrido este tiempo, las células se sedimentaron mediante un pulso de centrifugación a 15000 g y se resuspendieron en 200 μ l de SOC. Se tomaron alícuotas de 50 y 200 μ l, que se sembraron en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados para selección de las células que contenían el plásmido.

1.1.5. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se cultivó un inoculó de 50 μ l de *Agrobacterium tumefaciens* en 5 ml de TYNG (Tabla M3) suplementado con el antibiótico adecuado, 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 y se tomó una alícuota de 0,5 ml que se inoculó en 60 ml de TYNG y se cultivó a 28 °C y 225-250 rpm durante toda la noche. A la mañana siguiente el cultivo se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3500 g y 4 °C durante 6 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 20 ml de una solución fría de CaCl₂ 20 mM y se centrifugó a 3500 g durante 6 minutos para eliminar los restos de antibiótico. Se resuspendió nuevamente el sedimento en 1 ml de CaCl₂ 20 mM frío, y se tomaron 150 μ l de esta suspensión celular a los que se añadieron al menos 10 μ g de plásmido. Se agitó el conjunto y se congeló en nitrógeno líquido 5 minutos. Después de descongelar a temperatura ambiente, se adicionó 1 ml de LB y se transfirió el cultivo a tubos estériles de 20 ml, que se incubaron durante toda la noche en agitación a 200 rpm y 28 °C. Al día siguiente, se sembró el cultivo en medio TYNG suplementado con

antibiótico y se incubó a 28 °C hasta la visualización de colonias (aproximadamente tres a cuatro días).

1.2. Levaduras

1.2.1. Cepas utilizadas

Se utilizaron diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para llevar a cabo los estudios de expresión y caracterización de los transportadores iónicos de plantas (Tabla M4).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* constituye un sistema conveniente para la expresión heteróloga de genes eucariotas, ya que se multiplica rápidamente, está bien caracterizada genéticamente y es un sistema eucariota en el que están presentes los mecanismos post-trasduccionales de modificación de proteínas. Las células de levadura constituyen sobre todo el modelo de elección para la expresión de proteínas de membrana de plantas, tóxicas en muchos casos en bacterias (Haro et al 1993; Darley et al 2000).

Tabla M4. Características de las cepas de levadura utilizadas.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
W303-1B	(<i>Matax leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1 can1-100</i>)	Wallis et al 1989
ANT3	(<i>Matax leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1 can1-100 Δena1-4::HIS3 Δnha1::LEU2</i>)	Quintero et al 2000
WX1	(<i>Matax leu2-13 112 ura3-1trp1-1 his3-11 15 ade2-1 can1-100 Δnhx1::TRP1</i>)	Quintero et al 2000
AXT3	(<i>Matax leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11 15 ade2-1 can1-100 Δena1-4::HIS3 Δnha1::LEU2 Δnhx1::TRP1</i>)	Quintero et al 2000
AXT4	(<i>Matax leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11 15 ade2-1 can1-100 Δena1-4::HIS3 Δnha1::LEU2 Δnhx1::TRP Δkha::KanMX</i>)	Este trabajo

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este estudio derivan de W303-1B (*Mata leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1 can1-100*). La cepa ANT3 tiene disrupciones en los sistemas de transporte de Na⁺ mayoritarios en levadura: ENA1-4, ATPasas de tipo P responsables de la extrusión de Na⁺ y NHA1, un antiportador (K⁺, Na⁺)/H⁺ de la membrana plasmática. La cepa AXT3 tiene además una disrupción en el único antiportador (Na⁺, K⁺)/H⁺ tipo NHX de levadura, ScNHX1, y es altamente sensible al NaCl. La cepa WX1 sólo tiene una disrupción en el gen ScNHX1. La cepa AXT4 presenta las mismas disrupciones que AXT3 y además una disrupción en el gen KHA, un antiportador K⁺/H⁺ de Golgi o endosomal, que parece regular el pH citoplasmático (Maresova y Sychrova 2005).

1.2.2. Cultivo de levaduras

Los medios utilizados para el cultivo de las células de levadura se detallan en la Tabla M5.

En todos los casos, los medios se esterilizaron mediante autoclavado a 1 atmósfera de presión y 120 °C y durante 20 minutos. No obstante, algunos componentes como vitaminas, bases nitrogenadas, y antibióticos se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0,45 µm, antes de ser adicionados a los medios previamente autoclavados. La preparación de medios sólidos se realizó mediante adición de 20 g/l de bactoagar al medio líquido correspondiente previo al autoclavado.

Tabla M5. Medios de cultivo de levaduras.

APD/APG	YPD/YPG	SD/SG
H ₃ PO ₄ 8 mM L-Arginina 10 mM CaCl ₂ 0,2 mM MgSO ₄ 2 mM Glucosa/Galactosa ¹ 20g/l Vitaminas: Biotina 0,2 µg/l, Niacina 0,04 mg/l, Piridoxina 0,04 mg/l, Tiamina 0,04 mg/l, Ácido pantoténico 0,04 mg/l Elementos traza: BO ₃ H ₃ 0,05 mg/l , CuSO ₄ 4 µg/l KI 0,01 mg/l, Fe ₃ Cl 0,02 mg/l MnSO ₄ 0,04 mg/l NaMb 0,02 mg/l ZnSO ₄ 0,04 mg/l	Peptona 20 g/l Glucosa/Galactosa ¹ 20 g/l Extracto de levadura 10 g/l	Glucosa/Galactosa ¹ 20 g/l Acido Succínico-Tris, 50 mM pH 5,5; YNB ² (7 g/l)

¹ autoclavar separadamente para evitar caramelización; ² Yeast Nitrogen Base (Difco™)

Para seleccionar o cultivar levaduras transformadas con plásmidos confiriendo auxotrofías, se cultivaron las cepas en medio mínimo SD, al que se añadieron los compuestos necesarios para cada cepa a las concentraciones siguientes: Adenina (30 mg/l), Histidina (30 mg/l), Leucina (100 mg/l), Uracilo (100 mg/l) y Triptófano (100 mg/l). En todos los casos los aminoácidos se prepararon como soluciones acuosas concentradas, que fueron autoclavadas posteriormente.

Para cultivar levaduras en medios suplementados con cationes alcalinos se utilizó el medio AP (Rodríguez-Navarro y Ramos 1984), al que se añadió KCl o NaCl a las concentraciones indicadas. En los ensayos de

complementación de tolerancia a NaCl, KCl o Higromicina B se utilizaron los medios SD/SG y APD/APG, o el medio rico YPD/YPG, al que se añadió KCl, NaCl o Higromicina B después del autoclavado. Como fuente de carbono se añadió a los medios glucosa (D, 2%) o galactosa (G, 2%), ya que en algunos casos la expresión de los genes introducidos en los plásmidos utilizados estaba bajo control del promotor GAL1.

La temperatura de crecimiento de las levaduras fue de 28 °C. La manipulación de los cultivos en condiciones estériles se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal (Microflow modelo Horizontal 480).

Para cultivar levaduras en medio líquido, se inoculó una colonia procedente de un cultivo previo en 3 ml de medio o se inoculó en medio fresco una dilución 1/1000 de un cultivo madre saturado. El cultivo se incubó a 28 °C durante 1 día (medio rico) o 2 días (medio mínimo).

1.2.3. Transformación de levaduras

Se cultivó un inóculo de 50 µl de levadura en 3 ml de medio YPD líquido y se incubó durante toda la noche a 30 °C. El cultivo se centrifugó durante 30 s a 15000 g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de acetato de litio (LiAc) 100 mM. La suspensión resultante se incubó 5 minutos a 30 °C, se centrifugó de nuevo y al sedimento se adicionó 345 µl de una solución conteniendo PEG3350 al 35 % (p/v), 0,1 M LiAc y 3 mg/ml de esperma de salmón. A continuación se adicionó 5 µl del plásmido, y el conjunto se agitó 1 minuto, incubándose a 42 °C durante 20 minutos. Tras centrifugar la mezcla a 15000 g durante 30 s, se obtuvo un

sedimento celular que se resuspendió en 300 µl de H₂O destilada estéril y se sembró en medio SD sólido suplementado con los aminoácidos adecuados, incubándose a 28 °C durante 3 o 4 días, hasta que se visualizaron colonias.

1.3. Material vegetal

Se utilizó tomate (*Solanum lycopersicum* L., cultivar PE-73) como material vegetal para los estudios de expresión de los antiportadores LeNHX1, LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4 en tejidos y para los estudios de silenciamiento de LeNHX2.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo de la expresión de los genes LeNHX1, LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4 en especies de tomate tolerante y sensible a la salinidad, utilizando como material vegetal *Solanum pimpinelifolium* L., una especie silvestre tolerante a la salinidad, y *Solanum lycopersicum* L. cv volgogradskij, una especie cultivada sensible (Cuartero et al 1992).

También se estudió la relevancia del gen LeNHX2 en la tolerancia a la salinidad y nutrición de potasio, para lo cual realizó un análisis de fenotipos en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia que sobreexpresaban este gen.

1.3.1. Germinación de semillas y cultivo de plantas de *Arabidopsis*

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (0,1 g) se desinfectaron mediante la incubación con 1 ml de etanol al 70% durante un minuto y, posteriormente,

con 1 ml de una solución de hipoclorito sódico comercial al 70% conteniendo 20 μl de Tween 20, durante 5 minutos. Seguidamente, las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en placas Petri de 9 cm de diámetro a razón de 50 semillas por placa. Las placas contenían medio de germinación compuesto por los macro y micronutrientes del medio MS (Murashigue y Skoog, 1962), 1% de sacarosa y 0,7% de agar, ajustándose el pH a 6,2 con KOH previamente al autoclavado del medio a 120 °C durante 20 minutos. Una vez sembradas las semillas, éstas se incubaron a 4 °C en oscuridad durante 48 horas y, posteriormente, a 21 °C durante 3 semanas, con un fotoperiodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad y una intensidad lumínica de 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La manipulación de las semillas se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal. Las plántulas de *Arabidopsis* cultivadas durante 21 días en placas Petri fueron transferidas a semilleros conteniendo vermiculita previamente autoclavada a 120 °C durante 20 minutos. Estas plántulas se mantuvieron en los semilleros durante tres semanas más, al objeto de permitir la floración y fructificación, siendo regadas cada dos días con una solución nutritiva conteniendo los macro y micronutrientes del medio MS. Se mantuvieron las mismas condiciones lumínicas y de temperatura que las utilizadas para la germinación y cultivo *in vitro* de las plántulas en placas Petri.

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron también en hidropónico. Para ello, las semillas desinfectadas se germinaron en puntas de pipeta de 200 μl selladas (Norén et al 2004), conteniendo la solución mineral basal descrita por Cellier y colaboradores (2004) y 0.7 % agarosa, con el pH

ajustado a 6,0 con NaOH o KOH. Después de 10 días de cultivo en las mismas condiciones de iluminación y temperatura descritas para los cultivos en placas Petri, las plántulas eran transferidas a cubetas de 3 l (40 plántulas por cubeta) e incubadas 4 semanas más en la misma solución nutritiva, que era renovada dos veces por semana durante las dos primeras semanas y cada dos días durante las dos últimas semanas, al objeto de evitar contaminaciones. Las condiciones de cultivo en el sistema hidropónico fueron: $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 12 h luz/12 h oscuridad, 21 °C

1.3.2. Germinación de semillas y cultivo de plantas de tomate

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. A partir de estas semillas se produjeron plántulas *in vitro* que fueron utilizadas en los experimentos de transformación genética. Para ello, una vez esterilizadas, las semillas se germinaron *in vitro* en tubos de ensayo conteniendo medio de germinación (GM) compuesto por los macro y micronutrientes del medio MS, 1% de sacarosa y 0,7% de agar, ajustándose el pH a 6,2 con KOH previamente al autoclavado del medio a 120 °C durante 20 minutos. Después de 2-4 días en oscuridad a 24 °C, las plántulas se transfirieron a una cámara de cultivo donde se incubaron también a 24 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 h de oscuridad 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. A partir de los cotiledones transformados se regeneraron *in vitro* plantas completas, las cuales se transfirieron a semilleros conteniendo una mezcla 1:1 de suelo (Compo Sana® Universal) y vermiculita y, cuando alcanzaron un porte adecuado, se pasaron a macetas de 5 litros conteniendo suelo (Compo Sana® Universal). Las plantas transferidas a macetas se cultivaron en invernadero a 26 °C hasta alcanzar la fructificación, regándose cada dos días con solución de riego (Tabla M6).

Las plantas de tomate también fueron cultivadas en sistema hidropónico. En este caso, las semillas desinfectadas se incubaron en placas Petri sobre un papel de filtro estéril empapado en agua también estéril, a 28 °C y en oscuridad hasta que emergía la radícula (aproximadamente dos días). Las semillas germinadas se transferían entonces a cajas de plástico (13x13 cm) conteniendo arena de cuarzo esterilizada a razón de 15 semillas por caja. Las plántulas se cultivaron en este sistema en invernadero a 26 °C hasta alcanzar el estado de cuatro hojas, regándolas cada dos días con una dilución 1/10 de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon 1950). Posteriormente, las plántulas se transfirieron a cubetas de 3 litros, a razón de 6 plántulas por cubeta. En estas cubetas las plantas se cultivaron durante 7 días en una dilución 1/10 de solución para cultivo hidropónico (Hoagland y Arnon 1950) y durante 14 días en una dilución 1/4 de la misma solución (Tabla M6). En el caso de plantas transformadas, previamente al cultivo

hidropónico se realizó una selección mediante cultivo *in vitro* en medio de germinación compuesto por los macro y micronutrientes del medio MS y 200 mg/l de Kanamicina.

Tabla M6. Soluciones nutritivas utilizadas para el cultivo de tomate

	COMPOSICION	Notas
SOLUCION NUTRITIVA PARA EL RIEGO	<p>Macronutrientes $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 mM KNO_3 6mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM</p> <p>Micronutrientes H_3BO_3 60μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1μM</p> <p>Fe-EDTA 60 μM</p>	<p>La solución de macro- y micronutrientes y Fe-EDTA se autolcavan y almacenan a 4° C para evitar contaminaciones.</p>
SOLUCION NUTRITIVA PARA EL CULTIVO HIDROPÓNICO	<p>Macronutrientes $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,7 mM $(\text{NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4 mM $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM $(\text{NO}_3)_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM NO_3K 5 mM</p> <p>Micronutrientes BO_3H_3 45 μM $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 μM $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,75 μM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 μM</p> <p>Fe-EDTA 90 μM</p>	

Plántulas de 4 hojas seleccionadas en medios con antibiótico se transfirieron a las cajas con arena de cuarzo, regándolas durante 1 semana con una dilución 1/10 de solución Hoagland y durante otra semana con una dilución 1/8. Las plantas se transfirieron entonces a las cubetas de 3 l (4 plantas / cubeta), siendo cultivadas dos semanas más en una dilución 1/8 de solución Hoagland. Las soluciones nutritivas utilizadas para los cultivos hidropónicos estuvieron sometidas a aireación continua y se renovaron cada 2-3 días para evitar contaminaciones. Las condiciones de cultivo fueron: iluminación de $140 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad.

1.3.3. Transformación de Arabidopsis

Se partió de un inóculo de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con el plásmido de interés que se cultivó durante 24 h, a 28 °C y 220 rpm en 10 ml de medio TYNG suplementado con los antibióticos adecuados. El cultivo anterior se inoculó en 600 ml de TYNG suplementado los mismos antibióticos a las mismas concentraciones, y se mantuvo en incubación durante 48 h en idénticas condiciones de agitación y temperatura. Transcurrido este tiempo, las bacterias se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en 1 l de medio de infiltración compuesto por los macronutrientes y micronutrientes del medio MS (Murasigue y Skoog 1962), las vitaminas del medio B5 de Gamborg (Gamborg et al 1968), sacarosa 5 %, MES 2,5 mM pH 5,9 y 400 μl de Silwett L77, agente surfactante de baja

toxicidad que mejora notablemente la infección. Una vez resuspendidas en el medio de infiltración, las bacterias fueron utilizadas de forma inmediata para la transformación de *Arabidopsis*. Para la transformación se utilizaron plantas que habían sido cultivadas en una mezcla 1:1 de suelo y vermiculita durante 21 días, a 21 °C, con un fotoperiodo de 16h de luz / 8h de oscuridad e iluminación de 140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (apartado 1.3.1).

La transformación se realizó de acuerdo al método de de inmersión floral de Clough y Bent (1998). Las plantas transformadas se cultivaron a 23 °C con fotoperiodo de 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad e iluminación de 140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y se regaron con una solución nutritiva conteniendo los macro y micronutrientes del medio MS hasta que se completó la fructificación. En ese momento se interrumpió el riego, se dejaron secar las plantas y se aislaron las semillas de las silicuas secas.

1.3.4. Transformación de tomate

Para la transformación de cotiledones de tomate se siguió básicamente el método descrito por Ellul y colaboradores (2003). Los cotiledones, obtenidos de las plántulas germinadas *in vitro* (Fig. M3a), se separaron del resto de la plántula y se seccionaron transversalmente en dos segmentos (Fig. M3b). Los segmentos se incubaron en medio de precultivo (PCM) (Tabla M7), 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 *Agrobacterium* transformado con la construcción para el silenciamiento de LeNHX2. El cultivo de los segmentos

de cotiledón con *Agrobacterium* (24 segmentos cotiledón/ 30 ml de cultivo bacteriano) se llevó cabo en medio CCM desprovisto de agar (Tabla M7, Fig. M3c) y suplementado con 200 μM de acetosiringona, a fin de favorecer la infección de los cotiledones. El cocultivo se realizó durante 20 minutos, a 26 °C y en agitación (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 M7), 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 M7), para eliminar células de *Agrobacterium*. 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 y, posteriormente, a un medio de rizogénesis a fin de regenerar plantas completas.

Para inducir la formación de tallos, los fragmentos de cotiledón cultivados con *Agrobacterium* se incubaron en placas Petri conteniendo medio SIM no selectivo (SIM-NS) (Tabla M7) durante 48 horas, a 24 °C, bajo iluminación de 120 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-2}$ (16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad) y, posteriormente, en SIM selectivo (SIM-K) (Tabla M9, Fig. M3d) en las mismas condiciones anteriores.

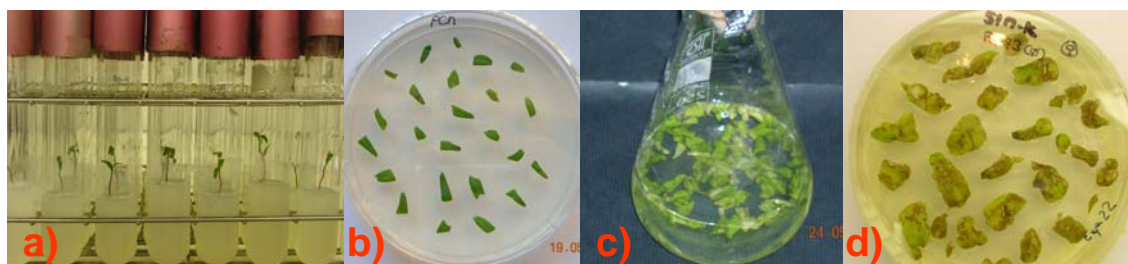


Figura M1. Transformación de cotiledones de tomate: a) plántulas de tomate obtenidas de semillas germinadas *in vitro* en medio GM; b) cultivo en PCM de segmentos de cotiledones aislados de plántulas cultivadas *in vitro*; c) cocultivo de segmentos de cotiledones y *Agrobacterium* en medio CCM; d) cultivo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

A partir de los cotiledones transformados, se observaba 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-K) (Figura M4a). 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 M4b, c y d). Se observó que por cada explanto se inducían de uno a tres tallos independientes (Figura M4d).

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-K (Tabla M7), 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 M5) y las plántulas se transferían entonces primeramente a semilleros conteniendo una

mezcla de suelo:vermiculita (1:1) y, a continuación, a macetas de 5 litros conteniendo suelo (Figura M6).



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



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



Figura M4. Cultivo en maceta con suelo de una planta de tomate regenerada a partir de cotiledones transformados.

Tabla M7. 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	SIMK	RM
Macro y micronutrientes MS	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Sacarosa (g)	10	30	30	20	30	30	20
Myo-inositol (mg)	-	100	100	100	100	100	100
Vitaminas SH (ml)	-	10	10	-	10	10	-
IAA (mg)	-	4	4	-	4	4	0,1
Kinetina (mg)	-	4	4	-	4	4	-
Zeatina (mg)	-	-	-	-	1	1	-
Kanamicina (mg)	-	-	-	-	-	100	100
Cefotaxima (mg)	-	-	-	600	400	300	-
Acetosiringona (μ M)	-	-	200	-	-	-	-
Agar (g)	8	8	8	-	8	8	8

MS: Murashige y Skoog (1962)

GM: medio de germinación

PCM: medio de precultivo

μ g/ml)

CCM: medio de co-cultivo

Vitaminas SH: Shahin EA (1985)

WM: medio de lavado

SIM: medio de inducción de tallos

NS, no selectivo; K, selectivo (kanamicina 100

RM: medio de enraizamiento

1.3.5. Recolección y conservación de semillas de plantas transformadas

Las semillas de las líneas de *Arabidopsis* transformadas se germinaron en placas Petri conteniendo el medio de germinación antes descrito, que se suplementó con el antibiótico de selección (Higromicina, 50 µg/ml). Tras 21 días, las plántulas se transfirieron individualmente a semilleros conteniendo vermiculita y una vez las rosetas alcanzaron las 8-10 hojas se fijaron sobre ellas aracones (Aracons™ Lehle Seeds, Round Rock, TX, EE. UU), a fin de impedir la fecundación cruzada y facilitar la recolección de las semillas. Las plantas se cultivaron en las condiciones ya descritas hasta que se completó el proceso de fructificación (aproximadamente 4 semanas); en este momento, se suspendió el riego, las plantas se secaron y las semillas, liberadas de las silicuas, se recogieron en la base de los aracones. Las semillas recolectadas se separaron de las impurezas mediante tamizado a través de mallas de diferente tamaño de poro. Finalmente, las semillas se transfirieron a *ependorfs* y se almacenaron a 4 ° C, en oscuridad y protegidas de la humedad.

Las semillas de plantas de tomate transformadas se germinaron *in vitro* en medio GM conteniendo el antibiótico de selección (kanamicina 200 µg/ml) en las condiciones ya descritas. Cuando las plántulas alcanzaron el estado de 4 hojas, fueron transferidas primero a semilleros y, posteriormente, a macetas de 5 l conteniendo suelo, manteniéndose en invernadero con solución de riego hasta que se produjo la floración y fructificación. Se evitó la fecundación cruzada separando unas macetas de otras aproximadamente 1 m y se favoreció la autofecundación depositando el polen de cada planta

sobre estigmas de flores de la misma planta con un pincel. Una vez obtenidos los frutos maduros (aproximadamente 4 meses desde la germinación de las semillas), éstos se recolectaron, se separó la pulpa de la semilla, se secaron las semillas entre láminas de papel de filtro durante dos días, se transfirieron a tubos de 10 ml y se almacenaron a 4 °C, en oscuridad y protegidas de la humedad hasta su uso.

1.3.6. Tratamientos salinos y de deficiencia en potasio

En este trabajo se llevó a cabo una evaluación fenotípica de las plantas de *Arabidopsis* y tomate transgénicas cultivadas en medios suplementados con NaCl o desprovistos de K. Para realizar este estudio se germinaron semillas de *Arabidopsis* en placas Petri conteniendo 1) medio MS suplementado con 50 mM NaCl o 2) medio MS modificado para disminuir la concentración de K hasta 100 µM NO₃K, realizando el aporte de nitrato al medio como NH₄NO₃ (20 mM) (Cellier et al 2004). En estos medios, las plántulas de *Arabidopsis* se cultivaron durante tres semanas en las condiciones de temperatura e iluminación descritas en el apartado 1.3.1. Por otra parte, plantas de *Arabidopsis* cultivadas en sistema hidropónico durante 4 semanas (apartado 1.3.1) se transfirieron a 1) solución nutritiva desprovista de K, lavando previamente las raíces de las plantas en 0,2 mM CaSO₄ (Cellier et al 2004) o 2) solución nutritiva suplementada con 100 mM NaCl (Cellier et al 2004). En ambos casos, el tratamiento se aplicó durante 7 días en las condiciones de iluminación y temperatura descritas en el apartado 1.3.1.

Para estudiar el efecto del NaCl sobre el fenotipo de plantas silenciadas de tomate se cultivaron éstas en sistema hidropónico en las condiciones descritas en el apartado 1.3.2 durante 2 semanas. El tratamiento salino consistió en la adición de 130 mM NaCl a la solución nutritiva durante los últimos 10 días del cultivo.

En este trabajo también se ha llevado a cabo un estudio de la expresión de los transportadores LeNHXs en plantas de tomate sensible (*S. lycopersicum* cv volgogradskij) y tolerante (*S. pimpinellifolium*) a la salinidad, sometidas a estrés salino durante periodos de tiempo cortos y largos. Para ello, las semillas esterilizadas se sembraron en cajas con arena de cuarzo hasta alcanzar el estadio de 4 hojas, momento en que fueron transferidas a cubetas de 3 l para cultivo hidropónico donde se cultivaron durante 3 semanas más en las condiciones descritas en el apartado 1.3.2. A continuación, se aplicó el tratamiento salino que consistió en 1) suplementar con 130 mM NaCl la solución nutritiva en que eran cultivadas las plantas o 2) suplementar la solución nutritiva en que eran cultivadas las plantas con concentraciones gradualmente crecientes de NaCl: 50, 100 y 130 mM NaCl, a intervalos de dos días, lo que representaba 7 días de tratamiento.

1.3.7. Determinación del contenido iónico

Para la cuantificación de los contenidos iónicos, el material vegetal se secó durante 48 horas a 80 °C. El material seco se separó en raíz y parte aérea, en el caso de las plantas de *Arabidopsis*, y en raíz, tallo y hojas, en el caso de las plantas de tomate y, posteriormente, fue molido y digerido en una

solución concentrada HNO₃: HClO₄ (2:1, v/v). Los contenidos de K⁺ y Na⁺ se determinaron en el material digerido por ICP-MS (Iris Intrepid II; Thermo Electron Corporation, Franklin, MA, USA) en el Servicio de Ionómica del CEBAS, CSIC, Murcia.

2. Métodos

2.1. Métodos generales de manipulación de ácidos nucleicos

2.1.1. 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 ADN polimerasa usada, entre otros factores. De forma general, el protocolo seguido en este trabajo se resume en la Tabla M8.

El termociclador utilizado fue *Mastercycler personal* (Eppendorf). En este trabajo se han utilizado diferentes polimerasas: *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs), *Pfu DNA polymerase* (Promega), *JumpStart™ Accutag™ LA DNA polymerase* (Sigma) y *Biotherm polymerase* (Genecraft).

Tabla M8. Protocolo general de PCR

MEZCLA PCR	PROGRAMA PCR
dNTP's (0,2 mM) cebador <i>forward</i> (0,3 μ M) cebador <i>reverse</i> (0,3 μ M) MgCl ₂ (3 mM) disolución tampón (1x) ADN polimerasa (0,02 U/ μ l) ADN molde (0,02 pg/ μ l - 0,2 ng/ μ l)	<ul style="list-style-type: none"> - Inicialización (94 °C, 3 minutos) - 20 a 25 ciclos <ul style="list-style-type: none"> -Desnaturalización (94 °C, 30 s) -Alineamiento (50-60 °C dependiendo de los cebadores, 45 s) -Extensión (72 °C, 1,5 min.) - Elongación final (72 °C, 7 min.) - Conservación (4 °C, tiempo indefinido)

2.1.2. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa

Para separar fragmentos de ADN se han utilizado geles horizontales de agarosa preparados en tampón TBE 0,5x (Tris/borato 45 mM, EDTA 1 mM), conteniendo bromuro de etidio (0,4 μ g/ml) para visualizar las bandas a la luz ultravioleta. En los casos en los que se requirió la extracción de los fragmentos de ADN del gel para procesamiento posterior (clonaje, secuenciación, etc), se utilizó tampón TAE 1x (Tris/acetato 40 mM, EDTA 0,1 mM), ya que el borato y las altas concentraciones de EDTA pueden inhibir reacciones enzimáticas posteriores. La concentración de agarosa en los geles fue de 0,7 a 2 %, dependiendo del tamaño del ADN a separar. Las muestras se prepararon en tampón de carga (sacarosa 50 % (p/v), Azul de Bromofenol

0,25 %, EDTA 0,1 M). La separación electroforética se realizó en el mismo tampón utilizado para la preparación del gel, a un voltaje entre 80 y 100 V.

2.1.3. Extracción y purificación de ADN de geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se utilizó *DNA Gel Extraction Kit* (Millipore), que permite extraer el ADN del gel por un proceso que incluye centrifugación. Para ello, la banda de agarosa que contiene el ADN se depositó en un dispositivo con un filtro de 0,45 μm (Durapore[®]) y, tras centrifugar a 5000g durante 10 min., se recogió el ADN en el filtrado. Alternativamente, hemos utilizado *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma[®]). En este caso, las bandas de agarosa conteniendo el ADN son solubilizadas y depositadas en un dispositivo de filtración provisto de una membrana de sílice que retiene el ADN que, seguidamente, se eluye con tampón Tris de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.1.4. Concentración de ADN por precipitación con alcohol

Para concentrar ADN por precipitación se adicionó a cada 100 μl de solución de ácido nucleico, 225 μl de etanol, 1 μl de tRNA o 2 μl de *Pellet Paint co-precipitant* (Novagen) y 11 μl de acetato sódico 3M, incubando la mezcla 20 minutos a -20 °C. A continuación, el conjunto se centrifugó a 15000g durante 30 minutos, a 4 °C en una microcentrífuga. El precipitado se lavó con etanol al 70 %, se secó al aire durante 30 minutos y se resuspendió en 20 μl de H₂O o tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA-Tris 1 mM pH 8).

2.1.5. Cuantificación del ADN o ARN

La concentración de ADN o ARN se estimó espectrofotométricamente utilizando un *NanoDrop*[®] *ND-1000 Spectrophotometer* o marcadores cuantitativos incluidos en los geles de agarosa.

2.1.6. Aislamiento de plásmidos

Se partió de un cultivo de 2 ml de células de *E. coli* incubado a 37 °C en medio líquido LB suplementado con el antibiótico de selección hasta que alcanzó una densidad óptica (DO) de 0,9-1,0 medida a 600 nm. El cultivo bacteriano se centrifugó, obteniéndose un sedimento celular que se resuspendió en 200 µl de 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 µl de una solución de lisozima al 5 % y se incubó la mezcla 2 minutos a 96 °C, para romper las células. 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 µl RNasa 1%, y se incubó 10 minutos a 68 °C para eliminar contaminaciones de ARN. Para precipitar el ADN plasmídico se añadió 10 µl de tampón CTAB (CTAB 5% y NaCl 0,5 M), se agitó y se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 300 µl de NaCl 1,25 M y se precipitó nuevamente el ADN, adicionando 750 µl de etanol al 96 %. Tras centrifugar en microcentrífuga a 14000 rpm durante 15 minutos, se lavó el precipitado con 700 µl de etanol al 70 % y se secó el

sedimento a 37 °C durante 10 minutos. El ADN se resuspendió en 20 µl de TE o en H₂O.

También llevamos a cabo el aislamiento de plásmidos utilizando *Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit* (Bio-Rad) conforme a las instrucciones del fabricante.

2.1.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron siempre en los tampones y las condiciones recomendadas por los fabricantes. Cuando hubo que digerir con más de una enzima y, en el caso de que no fueran compatibles sus tampones, tras digerir con la primera de las enzimas y después de inactivarla, se precipitó el ADN como se ha especificado en el apartado 2.1.4, pudiéndose tratar a continuación los fragmentos de ADN con la segunda enzima. Las manipulaciones posteriores de los productos de la digestión se realizaron tras separarlos mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (apartado 2.1.2) y extraerlos según se ha indicado en el apartado 2.1.3.

2.1.8. Clonaje de fragmentos de ADN

El clonaje de los fragmentos se llevó a cabo mediante ligación, utilizando *Rapid DNA ligation Kit* (Roche), siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

También se llevó a cabo el clonaje de fragmentos de ADN utilizando la tecnología *Gateway*, la cuál permite introducir el gen de interés de una

manera sencilla en distintos sistemas de análisis funcional, manteniéndose la orientación y el marco de lectura con una alta eficacia y eliminándose la necesidad de secuenciaciones secundarias o de subclonaje después de haber introducido el gen en un vector de entrada. Esta tecnología esta basada en las propiedades de integración y escisión del bacteriófago lambda en el genoma de *E. coli* por recombinación. En el sistema *Gateway*, las reacciones de integración y escisión se llevan al cabo *in vitro*, según se explica en la Figura M1.

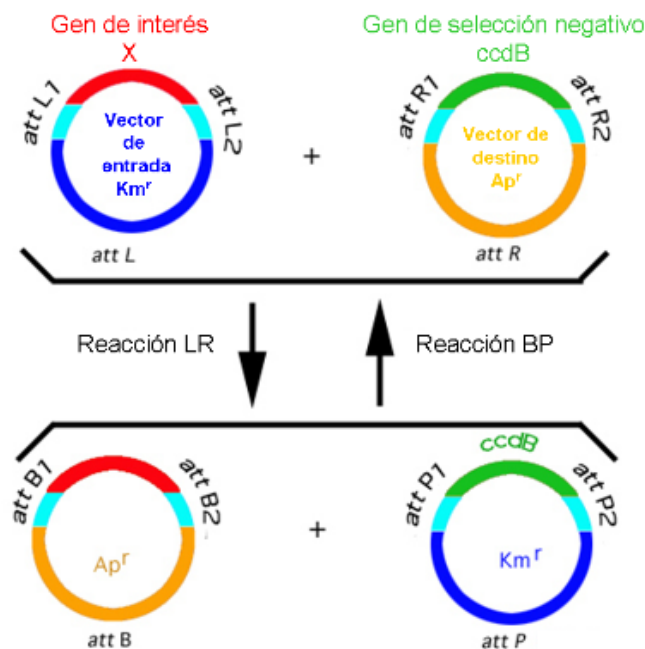


Fig. M5. Clonaje utilizando la tecnología *Gateway*. El gen a transferir está clonado en un vector de entrada, flanqueado por dos sitios de recombinación attL1 y attL2. El vector de destino contiene todos los elementos necesarios para la expresión del gen de interés, así como dos sitios de recombinación attR1 y attR2 que flanquean el gen de selección negativo *ccdB*. Tomado de www.invitrogen.com

La reacción *attL* x *attR* está catalizada por la mezcla de enzimas *Gateway*[®] *LR Clonase*[™] *II*. La mezcla contiene, por un lado, las enzimas implicadas en la recombinación del bacteriófago lambda, la Integrasa (Int) y la Escisionasa (Xis), y por otro lado, el Factor de Integración en el Hospedador (IHF) de *E. coli*.

Para generar los vectores de entrada hemos utilizado pENTR/D-TOPO (Invitrogen), que permite el clonaje de forma dirigida de productos de PCR entre los sitios de recombinación *attL1* y *attL2* (Fig. M2). El vector linearizado tiene asociado de forma covalente una Topoisomerasa I del virus *Vaccinia*, habiéndose añadido la secuencia GTGG a uno de los extremos 5' (Fig. M2). Este extremo permite la clonación de forma orientada de los productos de PCR generados, utilizando un cebador *forward* al que se ha añadido la secuencia CACC. El extremo GTGG del vector linearizado se une a las bases complementarias CACC del producto de PCR, permitiendo la ligación orientada por la Topoisomerasa I.

La clonación se realiza siguiendo las instrucciones especificadas en el [pENTR/SD/D-TOPO[®] Cloning Kit](#) y la selección se lleva a cabo con células competentes *E coli* Mach1[™] en medio LB suplementado con 50 µg/ml Kanamicina. Las secuencias nucleóticas de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla M9.

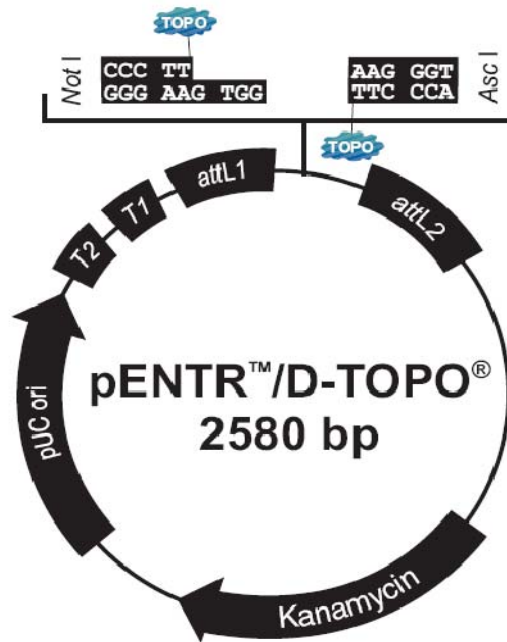


Fig. M6. Mapa del vector pENTR™/D-TOPO®.

Tabla M9. Cebadores usados en la clonación de LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4 en PENTR/D-TOPO

CEBADORES	SECUENCIA
LeNHX2 <i>forward</i>	5'-CACCATGGAGGATCATCTTCAGATT-3'
LeNHX2 <i>reverse</i>	5'-GTGGCCGTCATAACCAGCTCT-3'
LeNHX3 <i>forward</i>	5'-CACCATGGTGTGTTTGACTTTGGGAC-3'
LeNHX3 <i>reverse</i>	5'-ATGACCACTTGGTTCCGTTGG-3'
LeNHX4 <i>forward</i>	5'-CACCATGGCTTCTGTGCTGGCTTC-3'
LeNHX4 <i>reverse</i>	5'-TGGACCGTGTTCCGTTGGAGA-3'
LeNHX4stop <i>forward</i>	5'-CACCATGGCTTCTGTGCTGGCTTC-3'

2.1.9. Creación de vectores de expresión por recombinación entre el vector de entrada y el vector de destino

Una vez clonado el gen de interés en el vector de entrada, se puede dirigir a diferentes vectores de destino mediante recombinación específica y así llevar a cabo diversos experimentos de análisis funcional y de expresión de proteínas. Para llevar a cabo la reacción de recombinación se siguieron las instrucciones de *Gateway*[®] *LR Clonase*[®] *Enzyme Mix*. La selección de las colonias transformadas se llevó a cabo con células competentes de *E. coli* Mach1[™] cultivadas durante toda la noche en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados dependiendo del plásmido. A partir de las colonias transformadas se llevó a cabo el aislamiento del plásmido por el método ya descrito.

2.1.10. Secuenciación

Para la determinar la secuencia de los cDNAs completos o fragmentos de cDNAs purificados, y para comprobar que no se habían producido errores en el proceso de construcción de los distintos plásmidos se llevaron a cabo reacciones de secuenciación, utilizando 6,5 pmol de un oligonucleótido específico y una cantidad de ADN entre 0,4 y 1,0 µg. La secuenciación fue realizada por los servicios científicos del Instituto López Neyra (CSIC, Granada).

2.1.11. Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis y tomate

Se partió de hojas de Arabidopsis o tomate, que se congelaron en nitrógeno líquido introducidas en un eppendorf. Seguidamente, se adicionó 500 µl de tampón de extracción (100 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoetanol y 1,25 % SDS), incubándose la mezcla a 65 °C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionó acetato potásico hasta una concentración 1 M, manteniéndose el conjunto en hielo durante 5 minutos. Tras centrifugar a 15000 g durante 10 minutos, se obtuvo un sobrenadante que contenía los ácidos nucleicos, al que se adicionó 640 µl de isopropanol y 60 µl de acetato sódico 3 M, manteniéndose el conjunto a -20 °C durante 10 minutos. Los ácidos nucleicos se precipitaron por centrifugación a 15000g durante 10 minutos. El precipitado se lavó con 300 µl de etanol al 70 %, volviéndose a centrifugar a 15000g durante 5 minutos. Después de eliminar el etanol, el sedimento resultante se resuspendió en 50 µl de agua Milli Q.

2.1.12. PCR a tiempo real

Se cuantificó, mediante PCR a tiempo real, los niveles de expresión de los genes LeNHX1, 2, 3 y 4, utilizando un termociclador Biorad iCycler.

En la técnica de PCR a tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado sin necesidad de procesamiento post PCR de los productos amplificados, lo que incrementa el rendimiento y reduce las posibilidades de contaminación (Bustin y Nolan 2004). El análisis por PCR a tiempo real está basado en la

detección y cuantificación de ADN utilizando una sonda fluorescente. Mediante la detección de fluorescencia se puede medir, durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado, lo que permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa 2004). Las sondas fluorescentes utilizadas pueden ser agentes intercalantes o sondas específicas marcadas con fluorocromos (Bustin y Nolan 2004). En este trabajo la sonda utilizada ha sido el agente intercalante SYBR Green I (fluoróforo FAM-490), cuya emisión de fluorescencia aumenta notablemente cuando se une a ADN de doble cadena. La amplificación se realizó utilizando *Quantimix Easy Syg Kit* (Biotools).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μl conteniendo 10 μl de la mezcla de *Quantimix Easy Syg Kit*, 0,375 μM de cada cebador, 2 μl de de una dilución de fluoresceína 1/5000 en dimetil sulfóxido (DMSO), 1 μl de cDNA y 5,5 μl de agua Milli-Q. El protocolo de amplificación usado fue: Ciclo 1 (1X), 95 °C, 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. Los ciclos 3, 4 y 5 permitieron obtener los datos para construir la curva de *Melting*.

La expresión relativa del gen se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula: $2^{[\Delta C_t(\text{Control}) - \Delta C_t(\text{Muestra})]}$, donde $\Delta C_t = C_t$ ribosómico 18S - C_t LeNHX2 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.

2.2. Identificación de los antiportadores

2.2.1. Aislamiento de ARN de tomate

Para extraer ARN de distintos tejidos de la planta se utilizaron las columnas *Rneasy Plant Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante el proceso de aislamiento de ARN, las muestras se sometieron a un tratamiento con DNasa con el fin de destruir cualquier resto de DNA que pudiera interferir en la determinación del patrón de expresión por RT-PCR. Alternativamente, el ARN de las muestras vegetales se extrajo con *TRI® Reagent* siguiendo también las instrucciones del fabricante. En ambos casos, el ARN se resuspendió en *RNAsecure™ resuspension solution*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.2. Preparación de cDNA de una genoteca λ -zap

Algunos de los genes aislados en este trabajo se han identificado y clonado de una genoteca de cDNA de pelos radiculares de tomate (cv Moneymaker) en λ Uni-ZAP XR (Bucher et al 1997). Se amplificó la genoteca y se aisló el cDNA utilizando la cepa XL1Blue de *E coli* (Sratagene). Para ello, se tomó 50 ml de un cultivo fresco de bacterias cultivadas durante toda la noche a 37°C en medio LB suplementado con 0,2% de maltosa, se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos y se resuspendió el precipitado en aproximadamente 10 ml de MgSO₄ 10 mM, ajustando a 2 la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm (aproximadamente 1,6x10⁹ células/ml). Seguidamente, se añadieron 300.000 pfu de la genoteca en 1800 μ l de cultivo de bacterias (2,8x10⁹ células), y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se mezcló el cultivo con 50 ml de Top Agar a 37 °C y se extendió encima de medio LB sólido en 5 placas Petri de 20 cm de diámetro, incubándose el cultivo durante toda la noche hasta obtener una lisis bacteriana completa. Los fagos se eluyeron agitando suavemente durante una hora con λ diluent (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 8 mM MgSO₄) y centrifugando posteriormente durante 10 min a 4000 g y 4°C. Se añadió al sobrenadante 100 μ l de RNAsa y 100 μ l de DNAsa, en ambos casos de una solución de 10 mg/ml, y se incubó durante 30 min a 37°C y, posteriormente, durante 10 min en hielo. Se añadió lentamente y agitando 1 volumen de una solución saturada de sulfato de amonio a 4°C, y se incubó durante 20 min en hielo. Se centrifugó a 18000 g durante 15 minutos a 4°C y se resuspendió el precipitado en 8 ml de SM (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgSO₄ 8 mM, NaCl 100

mM, gelatina 0,01%). Se añadió 50 µl de RNAsa y 25 µl de DNAsa, de soluciones de 10 mg/ml, y se incubó durante 30 min a 37°C. Los fagos se lisaron por incubación durante 20 minutos a 68°C en una mezcla de 320 µl de EDTA 0,5M, 400 µl una solución de SDS al 10 % y 50 µl de una solución de 10 mg/ml de Proteinasa K, eliminándose las proteínas por extracción con Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25:24:1) seguida por extracción en Cloroformo/Alcohol Isoamílico (24:1) para eliminar restos de fenol. Tras separar la fase acuosa, se le adicionó 3,5 ml de una solución de acetato amónico 7,5 M y se precipitó el ADN añadiendo 8 ml de Isopropanol. El precipitado de ADN se recogió directamente con una espátula, se lavó 2 veces con 70% EtOH y se resuspendió en 100 µl de TE a temperatura ambiente, conservándose a -20°C.

2.2.3 Clonaje de antiportadores

Para clonar cDNAs completos a partir de secuencias EST (*Expressed Sequence Tag*), se han seguido dos procedimientos. En primer lugar se ha utilizado una genoteca de pelos radiculares de tomate (cedida por M Bucher, ETH, Zürich, Bucher et al 1997), para identificar y clonar por PCR anidada cDNAs completos. En segundo lugar, se han clonado cDNAs completos a partir de ARN de flores de tomate mediante RACE 3' y RACE 5'.

2.2.3.1. PCR anidada

Para clonar cDNAs completos de las genotecas, se utilizó la técnica de PCR interna o PCR anidada. Esta técnica comporta dos reacciones en cadena

de la polimerasa (PCR), con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en la segunda PCR (*internal* o *nested PCR*) flanqueen una región amplificada en la primera reacción (*external PCR*) (Fig. M3). El método de PCR interna se utiliza sobre todo cuando se buscan cDNAs poco abundantes. Para amplificar las regiones desconocidas se utilizó en la primera reacción un cebador universal del vector y otro específico del inserto. Como se desconocía la orientación de los insertos en el vector, se utilizaron cebadores del vector y de la secuencia conocida en sentido y antisentido. Después de esta amplificación, se usaron otros dos cebadores de la secuencia conocida y del vector, dando lugar a una amplificación más específica.

Las secuencias de los cebadores universales utilizados son 5-ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG (Bluescript-R) o 5-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG (Bluescript-F) para la primera PCR; y 5-CCG CTC T AG AAC TAG TGG ATC (Bluescript-R3) o 5-CTA TAG GGC GAA TTG GGT ACC (Bluescript-F2) para la segunda PCR. Por otra parte, se han usado un gran número de cebadores específicos para obtener las secuencias completas de los cDNAs de los genes (Anexo 1).

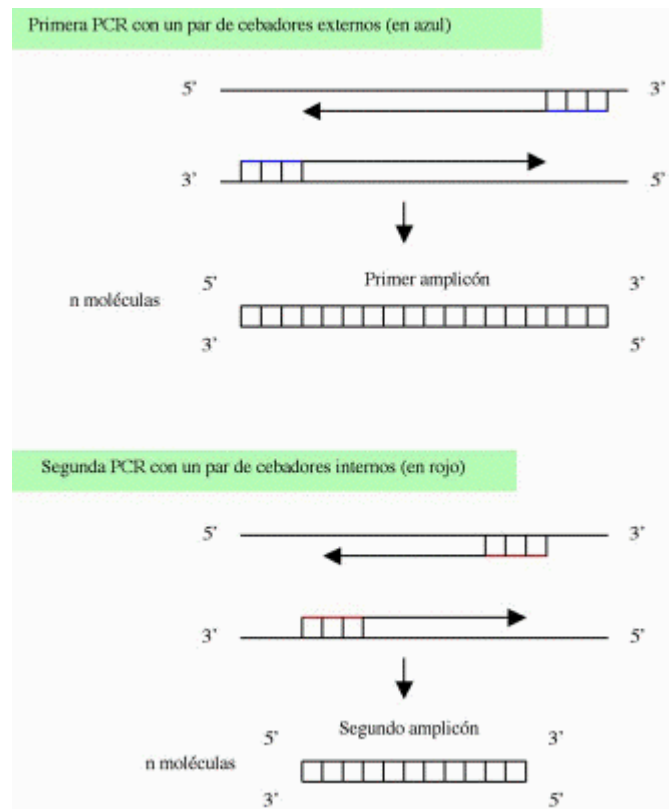


Fig. M3. Esquema de PCR interna o anidada

La primera PCR se efectuó según el protocolo general descrito en el apartado 2.2.1, con una temperatura de *annealing* de 54 a 60 °C, dependiendo de cada reacción de amplificación. La segunda PCR se llevó a cabo con distintas diluciones del ADN amplificado en la primera PCR, en las mismas condiciones y en un volumen total de 100 μ l, utilizando los cebadores anidados. Para evitar errores, durante la amplificación se empleó Taq polimerasas de alta fidelidad con actividad correctora de errores 3' a 5' exonucleasa, como *Phusion*TM *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England

Biolabs), *Pfu DNA Polymerase* (Promega), y *AcuTherm polymerase* (Genecraft). Además se llevó a cabo el menor número de ciclos posible para obtener suficiente cantidad de ADN.

2.2.3.2. RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

La técnica conocida como RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) es una variación de la reacción RT-PCR que amplifica secuencias desconocidas de cDNA correspondientes a los extremos 3' (3'RACE) o 5' (5' RACE) del ARN (Figs. M4 y M5). En ambos casos, el primer paso implica la conversión del ARN en una cadena simple de cDNA usando una reverso transcriptasa. A continuación, se lleva a cabo una PCR para la cual se diseñan dos cebadores que flanquean la secuencia desconocida. Uno de los cebadores es complementario a la secuencia conocida en el gen de interés mientras que el otro cebador es complementario a una secuencia conocida que no forma parte del gen. Este sitio de anclaje puede estar presente en la secuencia de cDNA de partida o puede adicionarse *in vitro* al finalizar la transcripción. El producto que se obtiene por la utilización de estos dos cebadores en la reacción de PCR abarca la secuencia desconocida de los extremos 5' o 3' y fragmentos conocidos del cDNA. El siguiente paso consiste en secuenciar este producto.

En la reacción 3'-RACE se usa como cebador para la reversotranscripción un oligo (dT) que se une a la cola poli(A) del mRNA. Este oligo (dT) también se usa como cebador en las siguientes

amplificaciones junto con el cebador complementario a la secuencia conocida del gen (Fig. M4).

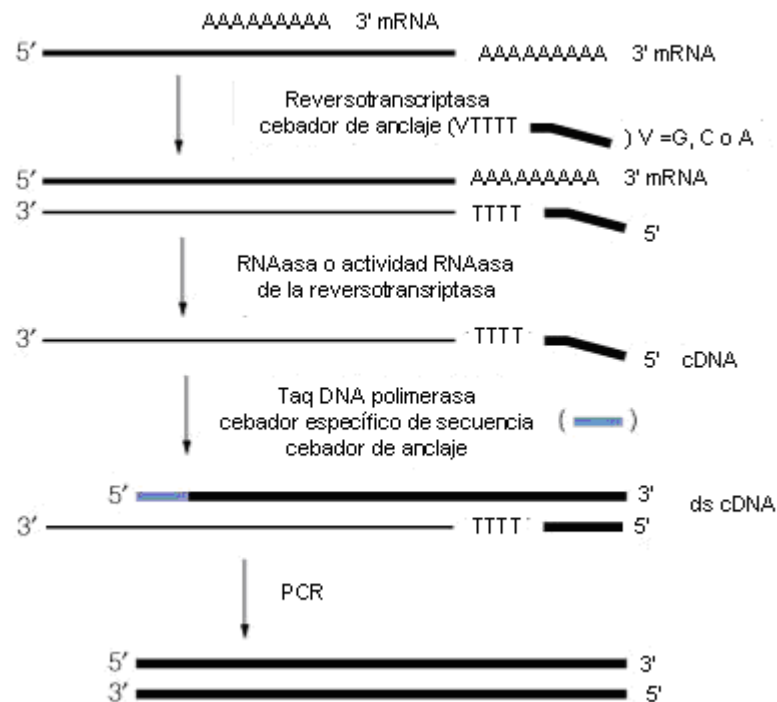


Fig. M4. Esquema de la reacción 3'RACE.

En la reacción 5' RACE, para la síntesis de la primera hebra de cDNA se usa como cebador un oligonucleótido complementario a una secuencia conocida del gen. Después de eliminar el molde de ARN creamos un *anchor site* en el extremo 3' de la hebra única de cDNA, usando una desoxinucleotidil transferasa. A continuación, se amplifica por PCR la región 5' utilizando como cebadores un *anchor primer* complementario a la nueva cola nucleotídica adicionada y otro *primer* complementario a una secuencia conocida del gen. Existen distintas variaciones del procedimiento 5' RACE

según la forma de adicionar el *anchor site* adyacente al extremo 5' del cDNA (Fig. M5).

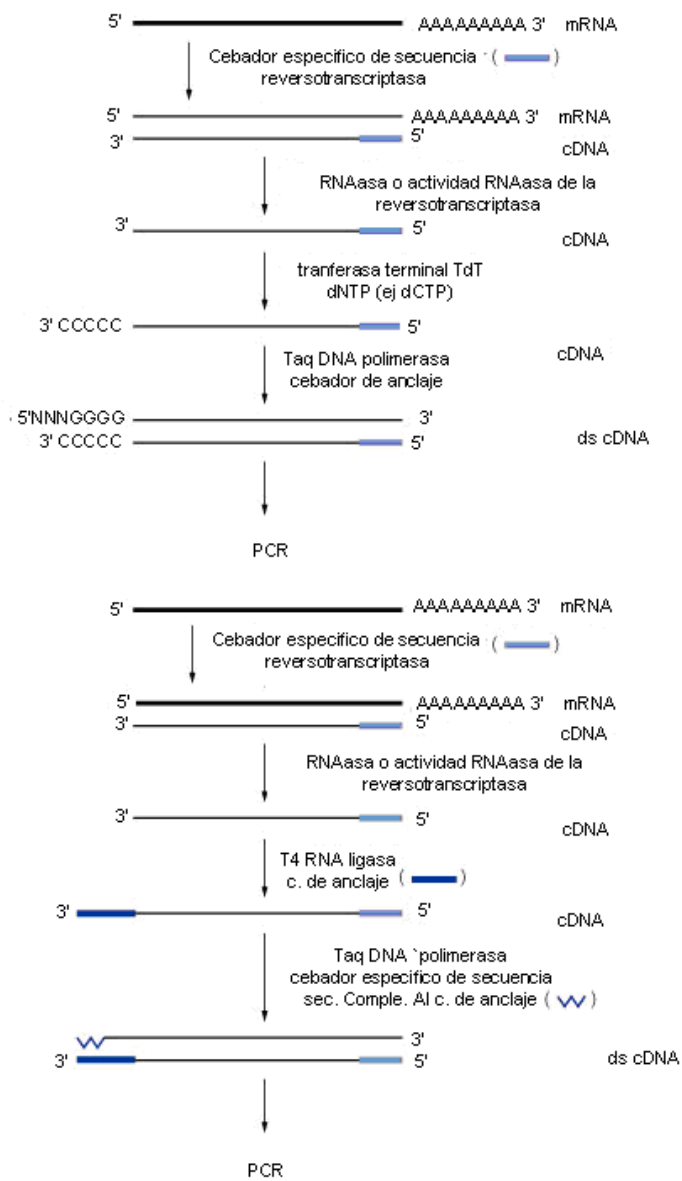


Fig. M5. Esquema de la reacción 5' RACE

En este trabajo hemos utilizado el kit *SMARTTM RACE cDNA* de Clontech que presenta algunas modificaciones respecto del procedimiento RACE tradicional. La reacción de PCR se realizó siguiendo las instrucciones del manual del *kit* y las condiciones de la amplificación fueron las descritas en el apartado 2.1.1. Los cebadores específicos para obtener las secuencias completas de los cDNAs se detallan en el Anexo 1.

2.3. Construcciones génicas utilizadas en los estudios funcionales.

2.3.1. Construcciones para expresión en levadura.

Los genes de interés clonados en el vector TOPO se integraron en distintos vectores de destino mediante recombinación específica para poder así llevar a cabo estudios de análisis funcional y de expresión de proteínas. Para ello se utilizó en la mayoría de los casos la tecnología *Gateway* descrita en el apartado 2.1.10. El vector de destino utilizado en los estudios de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* es pYES-DEST52 (Fig. M6).

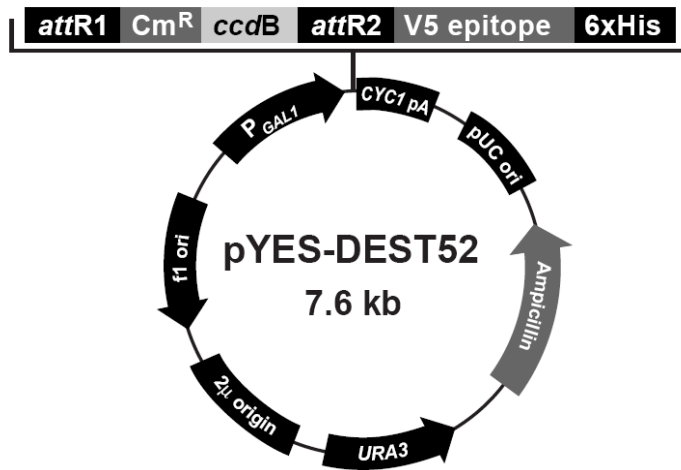


Fig. M6. Mapa del vector pYES-DEST52

Este vector contiene el promotor *Gal1* de levadura que se induce por galactosa y se inhibe en presencia de glucosa, de manera que se produce la expresión de los genes en medio suplementado con galactosa. Para facilitar el clonaje, el vector presenta dos sitios de recombinación, *attR1* y *attR2*, flanqueando el gen de selección negativa *ccdB*, que posibilitan una eficiente recombinación con un gen clonado entre los sitios de recombinación *attL* en un *attL*-flanked Gateway® entry vector como D-TOPO. Para poder identificar y purificar la proteína expresada en levadura, el vector permite la fusión del extremo C-terminal de la proteína codificada por el gen clonado con una secuencia que codifica un epítipo V5 y una secuencia de 6 histidinas. Dicho vector presenta un origen de replicación de alto número de copias (2μ) en levadura. Así mismo, el vector contiene un gen que codifica resistencia a ampicilina, lo que permite la selección de las colonias de *E. coli*

transformadas con la construcción y también el gen URA3 para la selección auxotrófica en levadura en un medio mínimo sin uracilo. Este vector ha sido utilizado en los estudios de expresión de LeNHX1, LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4 en levadura.

Para detectar las isoformas LeNHX2, 3 y 4 en membranas microsomales de levaduras transformadas con los genes de tomate, se llevó a cabo la clonación de los antiportadores LeNHX2, 3 y 4 provistos de una secuencia codificante de un epítipo de colas de histidinas RGS_{H10} en el extremo C-terminal utilizando el vector de expresión en levaduras pYes (Invitrogen), que contenía el promotor GAL1. Se generaron así los plásmidos LeNHX2RGS_{H10}, LeNHX3RGS_{H10} y LeNHX4RGS_{H10}.

2.3.2. Construcciones para expresión en plantas

En la Tabla M10 y M11 se enumeran las construcciones génicas utilizadas en este trabajo

Tabla M10. Listado de construcciones utilizadas

VECTOR	GEN	UTILIDAD DE LA COSTRUCCION
D-TOPO	LeNHX1	Clonación en Topo de LeNHX1 sin codón de stop
	LeNHX1+Stop	Clonación en Topo de LeNHX1 con codón stop
	LeNHX1RGSH10+Stop	Clonación en Topo de LeNHX1 con con una cola RGSH10 y codón stop
	LeNHX2	Clonación en Topo de LeNHX2 sin codón de stop
	LeNHX2+Stop	Clonación en Topo de LeNHX2 con codón stop
	LeNHX2RGSH10+Stop	Clonación en Topo de LeNHX2 con con una cola RGSH10 y codón stop
	LeNHX3	Clonación en Topo de LeNHX3 sin codón de stop
	LeNHX3+stop	Clonación en Topo de LeNHX3 con codón stop
	LeNHX3RGSH10+Stop	Clonación en Topo de LeNHX3 con con una cola RGSH10 y codón stop
	LeNHX4	Clonación en Topo de LeNHX4 sin codón de stop
	LeNHX4+stop	Clonación en Topo de LeNHX4 con codón stop
	LeNHX4RGSH10+Stop	Clonación en Topo de LeNHX4 con con una cola RGSH10 y codón stop

pYES-DEST52	LeNHX1	Expresión heteróloga de LeNHX1 sin codón de stop
	LeNHX1+Stop	Expresión heteróloga de LeNHX1 con codón de stop
	LeNHX1RGS10+Stop	Expresión heteróloga de LeNHX1 con una cola RGS10 y con codón de stop
	LeNHX2	Expresión heteróloga de LeNHX2 sin codón de stop
	LeNHX2+Stop	Expresión heteróloga de LeNHX2 con codón de stop
	LeNHX2RGS10+Stop	Expresión heteróloga de LeNHX2 con una cola RGS10 y con codón de stop
	LeNHX3	Expresión heteróloga de LeNHX3 sin codón de stop
	LeNHX3+stop	Expresión heteróloga de LeNHX3 con codón de stop
	LeNHX3RGS10+Stop	Expresión heteróloga de LeNHX3 con una cola RGS10 y con codón de stop
	LeNHX4	Expresión heteróloga de LeNHX4 sin codón de stop
	LeNHX4+stop	Expresión heteróloga de LeNHX4 con codón de stop
	LeNHX4RGS10+Stop	Expresión heteróloga de LeNHX4 con una cola RGS10 y con codón de stop
pCAMBIA1303	LeNHX2RGS10+Stop	Sobreexpresión de LeNHX2
pKannibal	LeNHX2 (entre aa699-aa1297)	Silenciamiento de LeNH2
variante del <i>GFPmut1</i>	LeNHX2	Localización de LeNHX2 con GFP en C-terminal
p2GWF7,0	LeNHX3	Localización de LeNHX3 con GFP en C-terminal
	LeNHX4	Localización de LeNHX4 con GFP en C-terminal
p2FGW7,0	LeNHX4+stop	Localización de LeNHX4 con GFP en N-terminal

2.3.2.1. Sobreexpresión

Para sobreexpresar el gen LeNHX2 en *Arabidopsis thaliana* se utilizó el vector pCAMBIA1303. El T-DNA de este vector binario contiene el promotor 35S y el terminador NOS que permiten dirigir la expresión del gen de interés y facilitar la fusión con el gen reportador Gus-gfp5, presente entre los sitios de restricción NcoI y BstEII, así como el gen de resistencia a Higromicina también bajo control del promotor 35S. Con el fin de generar un vector para dirigir la expresión de LeNHX2 en plantas, hemos clonado la secuencia codificante de LeNHX2 a la que se le había añadido una secuencia codificante de un *tag* de histidinas, RGS (H) 10, en la posición C-terminal, en el vector de expresión pCAMBIA1303 (Venema et al 2003), reemplazando la secuencia codificante de Gus-gfp5 entre los sitios de restricción NcoI y BstEII. Para ello, el sitio NcoI en la posición 1346 de LeNHX2 se eliminó por *overlap extension PCR*, cambiando la secuencia nucleotídica como se indica en la Figura M7.

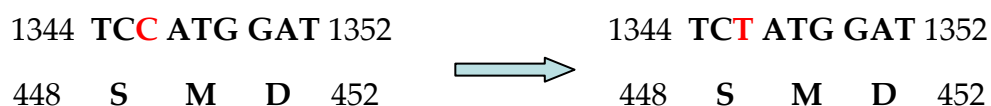


Fig. M7. Eliminación del sitio NcoI de la posición 1346 de LeNHX2

Se obtuvo así el plásmido pKV93 (Fig. M8). Para confirmar la fidelidad de la construcción generada, la región codificante del transportador incluido

en el plásmido pKV93 fue secuenciada en ambas direcciones. Este plásmido se utilizó para transformar *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3501

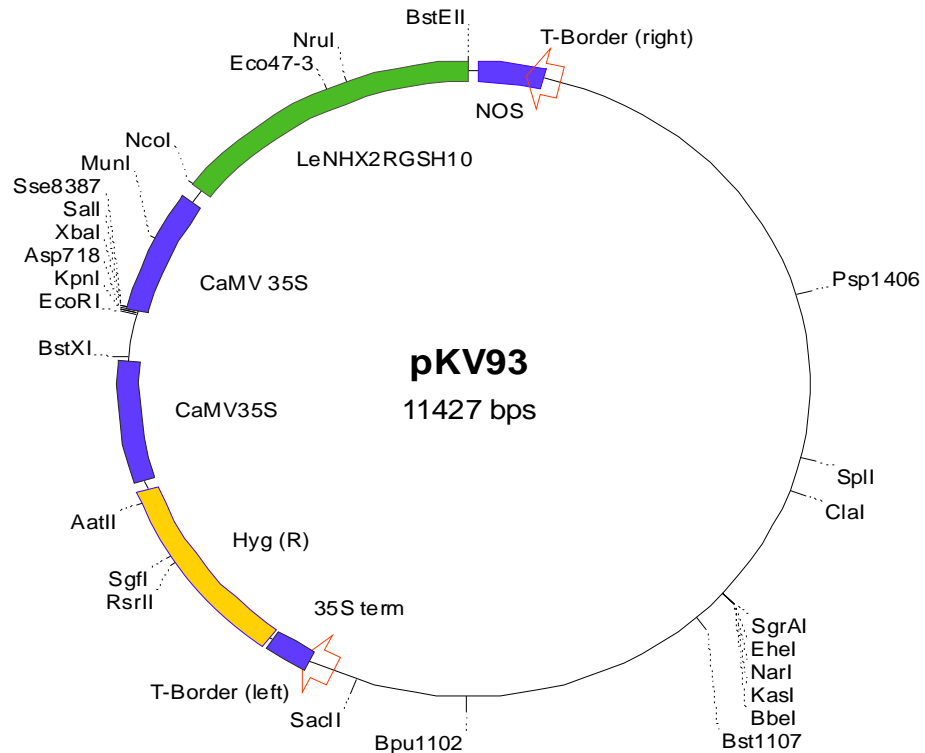


Fig. M8. Plásmido pKV93 con la construcción para la sobreexpresión de LeNHX2.

2.3.2.2 Silenciamiento

En este trabajo hemos llevado a cabo el silenciamiento génico post-transcripcional de LeNHX2, el cual debe reducir enormemente la acumulación de mRNA de este transportador, sin afectar a la transcripción (Vaucheret et al 2001). La construcción para el silenciamiento de este gen se obtuvo mediante la clonación en orientación sentido y antisentido en el

vector pKANNIBAL de un fragmento de PCR de 604 pares de bases del extremo 3' del gen (Wesley et al 2001) (Figs. M9 y M10).

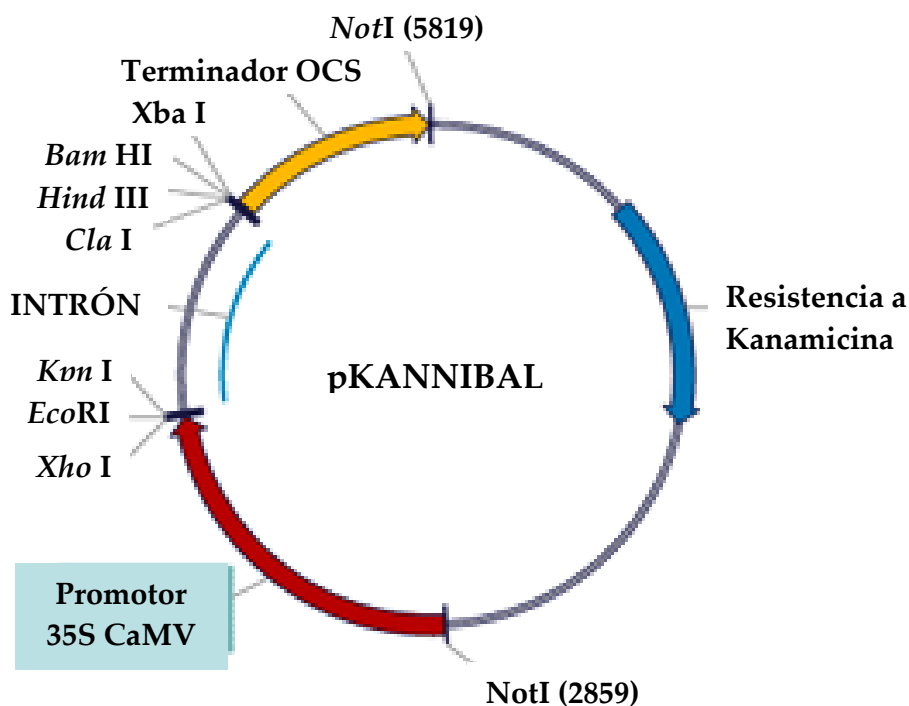


Fig. M9. Mapa del vector pKannibal

El vector pKANNIBAL fue diseñado de forma que se pudiese insertar un fragmento de PCR en orientación sentido en el *polilinker* XhoI.EcoRI.KpnI y en orientación antisentido en el *polilinker* ClaI.HindIII.BamHI.XbaI. Los cebadores utilizados fueron:

Forward

5 CGCGGATCCTCGAGTCAGCTGGTGTGGAG 3
BamHI XhoI

Reverse

5 CGACAAGCTTGAATTCATGGTTCCTGCCG 3
HindIII EcoRI

Dando lugar en la amplificación por PCR de un fragmento BamHI-XhoI-LeNHX2--EcoRI-HindIII, que se clonó en sentido en XhoI-EcoRI, y en antisentido en HindIII-BamHI.

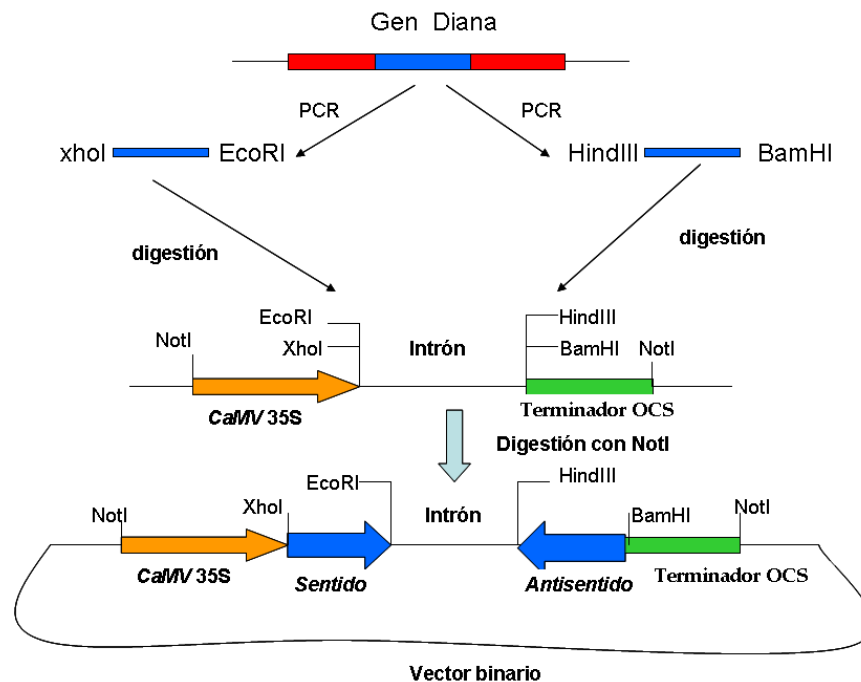


Fig. M10. Construcción hairpinRNAi en el plásmido pKANNIBAL. Un fragmento del gen diana se amplifica por PCR y se clona secuencialmente a ambos lados del intrón, para formar los dos brazos de la horquilla. El *cassette* "hairpin" se clona en un vector binario adecuado en un único paso, usando los sitios de restricción NotI.

Las construcciones realizadas en pKANNIBAL fueron subclonadas como fragmentos NotI en el vector binario pART27 (Fig.M11) e introducidas en *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404.

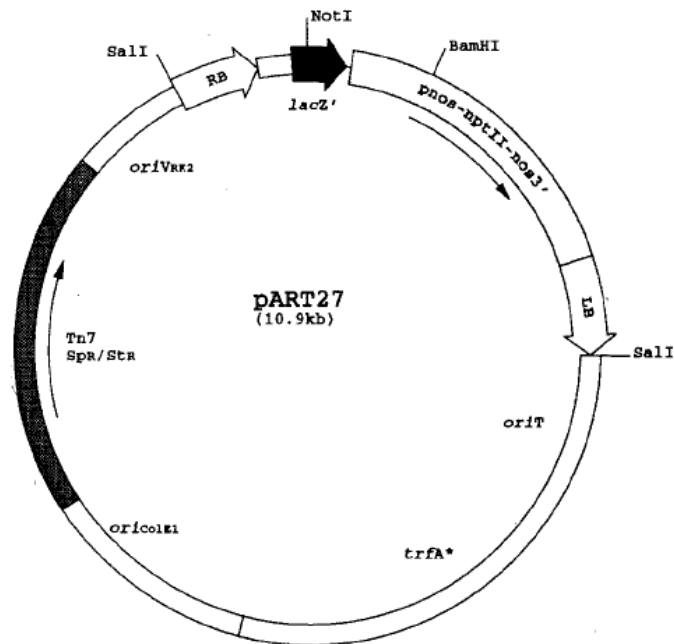


Fig. M11. Mapa del vector pART27: Origen de replicación RK2 para la replicación en *E. Coli* y *Agrobacterium*, origen de replicación ColE1 RK2 de alto número de copias y gen de resistencia Espectinomicina/Estreptomicina para la selección en bacterias (Andrew 1992).

2.3.2.3. Localización subcelular

Para los estudios de localización subcelular de LeNHX2, 3 y 4 se realizó una fusión de las construcciones génicas correspondientes a cada uno de los transportadores con la secuencia que codifica la proteína GFP. En el caso de los genes LeNHX3 y LeNHX4 hemos utilizado vectores basados en la tecnología *Gateway*. En el caso de LeNHX2 hemos utilizado vectores convencionales

La construcción LeNHX2::GFP se generó a partir de una variante del gen *GFPmut1* con la fluorescencia aumentada y optimizada para su

traducción en células eucariotas (Cormack et al 1996). Las secuencias codificantes del extremo C-terminal de LeNHX2 y N-terminal del polipéptido GFP fueron modificadas por PCR usando oligonucleótidos LeNHX2-Not: 5'-CCA CCG CGG CCG CCG TGG CCG TCA TAA CCA GC-3' y GFP-Not: 5'-GCT GGC GGC CGC GGT GGG TGA GAA GGG CGA GGA GGT G-3' (los sitios de reconocimiento de Not1 aparecen subrayados). La digestión por Not1 de las secuencias amplificadas y su subsiguiente ligación generaban una fusión de GFP al extremo C-terminal de LeNHX2 en el marco de lectura adecuado. La construcción LeNHX2::GFP se clonó en el vector pGreen-35S, para llevar a cabo transformación transitoria (<http://www.pgreen.ac.uk>).

Para la localización subcelular de LeNHX3 y LeNHX4 utilizamos el vector p2GWF7 (Karimi et al 2005) (Fig. M12), que permite llevar a cabo experimentos de localización transitoria en células vegetales. Este vector contiene el promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor, el gen *egfp* (GFPmut1, Cormack et al 1996) que codifica una proteína fluorescente que se fusiona con la proteína de interés en el extremo C-terminal, dos sitios de recombinación tR, *attR1* y *attR2*, para una eficiente recombinación con un *attL-flanked Gateway® entry vector* y un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las células transformadas con la construcción. Las construcciones obtenidas se designaron p2GWF7,0/LeNHX3 y p2GWF7,0/LeNHX4.

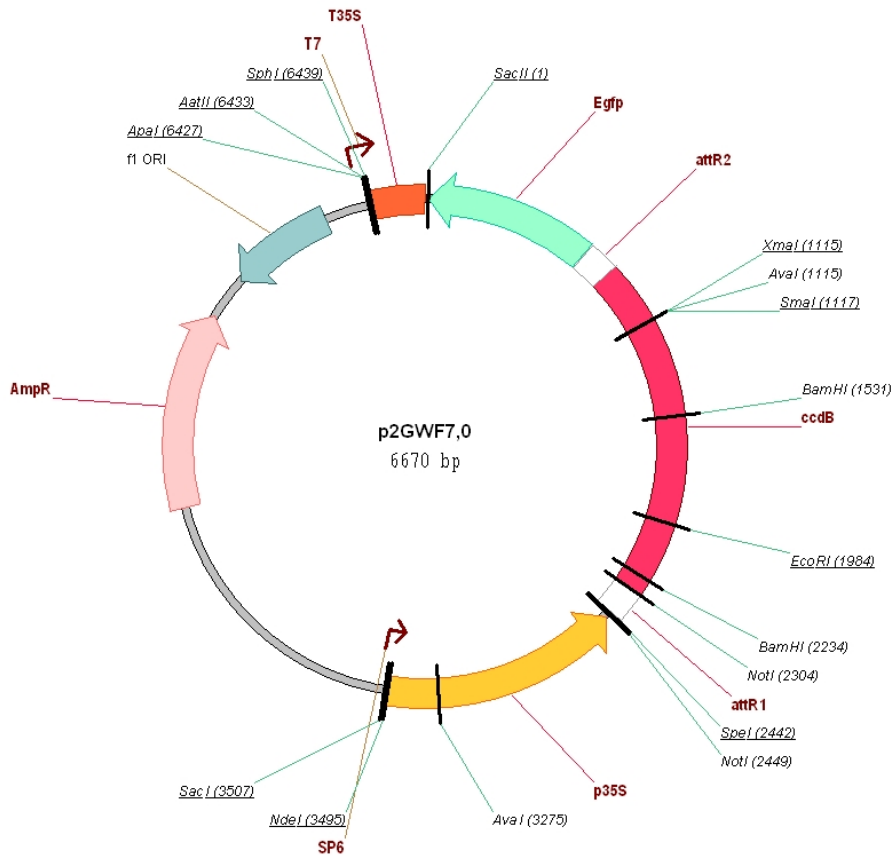


Fig. M12. Mapa del vector p2GWF7,0 (Karimi et al 2005 <http://www.psb.ugent.be/gateway/>)

Además, se utilizó el vector de expresión p2FGW7 (Fig. M13), que también porta construcciones que codifican la proteína egfp, que en este caso se fusiona con el extremo N-terminal del transportador.

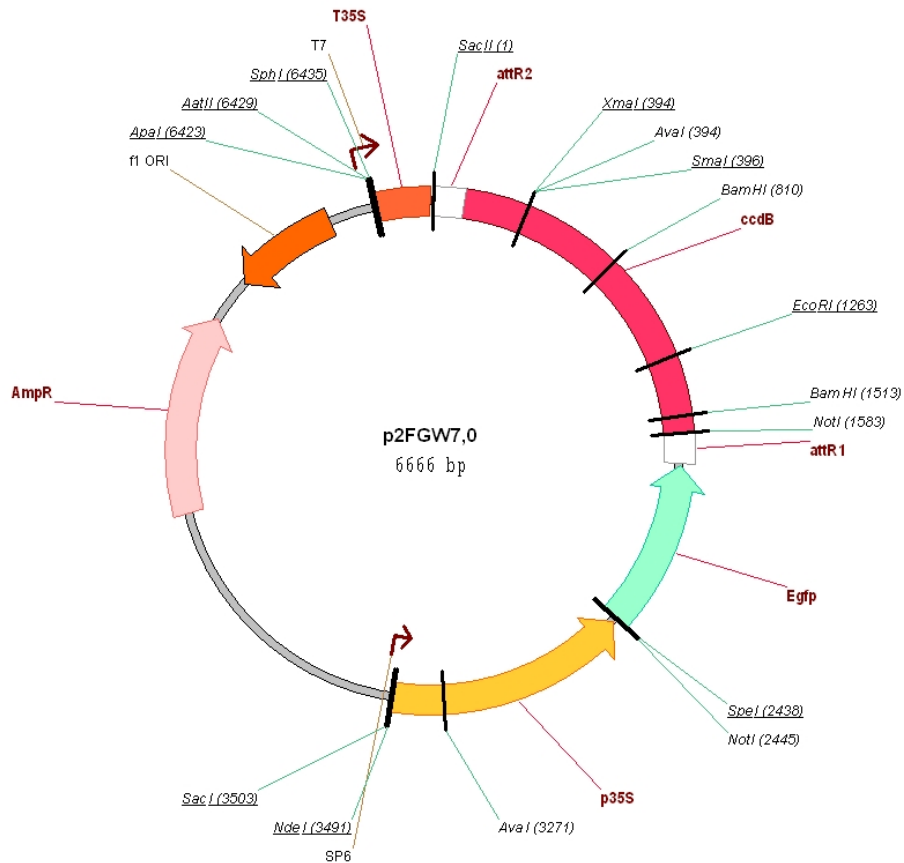


Fig. M13. Mapa del vector p2FGW7,0 (Karimi et al 2005 <http://www.psb.ugent.be/gateway/>)

2.4. Estudios de expresión de antiportadores LeNHXs en plantas

Se ha ensayado la expresión de los distintos genes LeNHX identificados por técnicas basadas en análisis por PCR. Por un lado, se ha determinado la expresión de los antiportadores LeNHX en diferentes tejidos

por RT-PCR utilizando ARN aislado de raíz, tallo, hoja y flor de plantas de tomate. Por otro lado, hemos realizado un estudio más preciso de los cambios inducidos por el estrés salino en los niveles de expresión de estos antiportadores en plantas de tomate sensibles y tolerantes a la salinidad utilizando la técnica de PCR a tiempo real.

2.4.1. Determinación de la expresión en distintos tejidos por RT-PCR

Se extrajo ARN de raíz, tallo, hoja, flor y fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*, cultivar PE-73), según se ha descrito en el apartado 2.2.1. Para los experimentos de retrotranscripción se partió de 1 µg de ARN y se utilizó *enhanced avian HS RT-PCR kit* (Sigma) que permite sintetizar una hebra de cDNA a partir del ARN total extraído, utilizando *random nonamers* (cebadores que se unen al azar al ARN) y la enzima transcriptasa inversa de virus de la mieloblastosis de ave (AMV-RT). Previo a la reacción de retrotranscripción, se incubó 1 µg de ARN total con 0,5 mM de cada uno de los dNTP's (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) y 3,5 µM de los cebadores *random nonamers* durante 10 min a 77 °C. Tras un breve enfriamiento en hielo, se añadió tampón de la reacción AMV-RT (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 40 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 1mM DTT), 0,25 U/µl de inhibidor de RNAsas y 0,5 U/µl de AMV-RT, en un volumen total de 20 µl. La reacción se llevó a cabo durante 50 min a 42 °C. A continuación se determinó la presencia de los genes LeNHX1, 2, 3 y 4 en las distintas preparaciones de cDNA mediante análisis por PCR (apartado 2.1.1.), utilizando los cebadores descritos en la Tabla M11.

Tabla M11. Cebadores utilizados para el análisis por PCR de la expresión de LeNHX1, 2, 3 y 4 en distintos tejidos de plantas de tomate.

CEBADORES	SECUENCIA
LeNHX1 forward	5'-TGCTTTTGCAACACTCTCATTT-3'
LeNHX1 reverse	5'-AAACCAGATGGTCGTACAGGAT-3'
LeNHX2 forward	5'-GCTTTAGTGTTTGGGGAATCTG-3'
LeNHX2 reverse	5'-CCAAATATGCACAACCAAACAC-3'
LeNHX3 forward	5'-GGATGAAACACCCTTACT-3'
LeNHX3 reverse	5'-AAGCTAATCCTCTCCTCC-3'
LeNHX4 forward	5'-CTATTTGAGTGGGATTCT-3'
LeNHX4 reverse	5'-TGTGGTGGCAGCAGGAGACTTA-3'

2.4.2. Determinación de los niveles de expresión de transportadores LeNHXs en especies de tomate sensible y tolerante al NaCl por PCR en tiempo real

Se llevó a cabo una extracción de ARN de raíz, tallo y hoja de *Solanum pimpinifolium* y *Solanum lycopersicum* cv. Volgogradski, según se ha descrito en el apartado 2.2.1. Con el ARN extraído se realizó una RT-PCR utilizando *enhanced avian HS RT-PCR kit* (Sigma), según el protocolo descrito en el apartado 2.4.2. A continuación, se realizó la reacción de PCR a tiempo real de acuerdo a la metodología indicada en el apartado 2.1.18., utilizando 1 µl de cDNA de una dilución 1/10 para el gen problema y 1/100 para el gen de referencia y cebadores específicos de cada uno de los genes (Tabla M12). Como gen de referencia se usó el ribosómico 18S.

Tabla M12. Cebadores utilizados en los ensayos de PCR a tiempo real para cuantificar los niveles de expresión de los genes LeNHXs en especies de tomate tolerante y sensible a la salinidad

PRIMERS	SECUENCIA
LeNHX1 forward	5'-GACAGTCCTGGAAAATCT-3'
LeNHX1 reverse	5'-GGTTATCAGCCCAAACACC-3'
LeNHX2 forward	5'-CCTTTGAGGGGAACAATGG-3'
LeNHX2 reverse	5'-CATCTTCATCTTCGTCTCC-3'
LeNHX3 forward	5'-CTCAAGAGTCACCACCAAGCA-3'
LeNHX3 reverse	5'-CCAACCAAAACAAGACCCAACA-3'
LeNHX4 forward	5'-TGGTGGGCAGGTTTGATGAGAG-3'
LeNHX4 reverse	5'-TGTGGTGGCAGCAGGAGACTTA-3'
18S forward	5'-AAAAGGTCGAGCGGGCT-3'
18s reverse	5'-CGACAGAAGGGACGAGAC-3'

2.5. Caracterización funcional de los antiportadores en levadura

Para llevar a cabo los estudios de complementación de *ScNHX1* y *ScKHA1* se utilizaron las cepas WX1, AXT3 y AXT4 de *Sacharomices cerevesiae* (Tabla M4) transformadas con los plásmidos para la expresión de los antiportadores en levadura (Tabla M9). Todo el proceso se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.2.3.

2.5.2. Disrupción de *ScKHA1*

Para determinar si los genes LeNHX complementan alguno de los fenotipos causados por la disrupción de *ScKHA1*, se construyó a partir AXT3 la cepa AXT4 con una disrupción en el gen *ScKHA1* (Δ ENA1-4, Δ nha1, Δ nhx1, Δ kha1). Para ello se llevó a cabo la fusión por PCR de las secuencias

que flanquean a KHA1, con un *cassette* de disrupción que contiene el gen de resistencia a Geneticina. Se realizó una PCR usando como molde el plásmido pUG6, que contiene el módulo de disrupción *loxP-kanMX-loxP*, con los cebadores 5'-ATG GCA AAC ACT GTA GGA GGA ATT CTG TCG GGT GTA AAT CCG TTC GTA CGC TGC AGG TAG AC -3' (*forward*) y 5'-TTA TTC AGA CGA AAA ATG GTG CAC AAT AAG GGT GTC AAA ACG GCA TAG GCC ACT AGT GGA-3' (*reverse*) (La secuencia de pUG6 está subrayada), de acuerdo con Maresova y colaboradores (2005). Con el producto de la PCR se transformó la cepa AXT3, en la cual se produce una recombinación homóloga que da como resultado la delección de KHA1 y la integración simultánea del gen marcador. Los mutantes positivos se seleccionaron en placas de YPD suplementadas con Geneticina® (200 µg/ml). Se comprobó la disrupción en la cepa AXT4 por PCR, utilizando ADN genómico y los cebadores 5'-CAT TTG ATGCTT GAT GA-3' y 5'-TGA TAT ATG GTC TCT GGG-3'.

2.5.3. Determinación del crecimiento por el método de goteo (*Drop test*)

Se analizó mediante *drop test* la capacidad de las distintas cepas de levadura para crecer en medios suplementados con NaCl, KCl, Higromicina B y en medios con distinto pH. Para ello, se cultivaron 3 ml de un inóculo de las distintas cepas en medio selectivo SD hasta alcanzar una DO a 660 nm de aproximadamente 1,0. Se realizaron entonces diluciones 1, 1/10, 1/100 y 1/1000 con agua destilada, sembrándose una alícuota de 5 µl de cada una de las diluciones en medios YPD/YPG, APD/APG o SD/SG suplementados con

NaCl, KCl o Higromicina B. Después de tres a cuatro días de cultivo a 28 °C, las placas eran fotografiadas.

2.5.4. Aislamiento de microsomas

Se aislaron membranas microsomales de levaduras transformadas con los antiportadores de tomate. Estas membranas se utilizaron para llevar a cabo estudios de inmunodetección y para purificar las proteínas antiportadoras, utilizando para ello sistemas de detección de la cola de histidinas asociada al extremo C-terminal de los antiportadores.

Se partió de levaduras cepa AXT3 transformadas con los antiportadores provistos de una cola RGS(10) en el vector pYES-DEST52. Para los experimentos de purificación de proteínas, se inculó 10 ml de un precultivo saturado preparado en medio selectivo SD, en 10 l de medio APG suplementado con Adenina (30 µg/ml), y se cultivó durante dos días a 28 °C, hasta alcanzar una DO a 660 nm de aproximadamente 0,6-1,0 (equivalente a unos 30-50 g de peso fresco de levaduras).

Las células se sedimentaron por centrifugación a 2500 g durante 5 minutos. El sedimento obtenido se lavó con agua destilada fría y se volvió a centrifugar. Las células se resuspendieron en 200 ml de una mezcla fría de 0,2 M Tris HCl pH 8,0; 150 mM KCl; 15 mM EDTA-Na₂ pH 8,0; 10 mM DTT y 1 ml de cocktail inhibidor de proteasas (50 mg/ml AEBSF, 1 mg/ml Pepstatina A, 1 mg/ml Bestatina, 0,5 mg/ml E64, 1 mg/ml Fenantrolina). Las células se transfirieron a un homogenizador *beadbeater* (Biospec) al que se adicionaron bolas de vidrio de 425-600 µm de diámetro (Sigma) hasta cubrir las aspas.

Las células se rompieron mediante tres pulsos de 45 segundos cada uno, con un intervalo de un minuto entre ellos. El homogenado se centrifugó 15 minutos a 2500 g, obteniéndose un sobrenadante que se volvió a centrifugar a 100000 g durante 35 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 25 ml de una solución de Glicerol al 20 %; 0,1M Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA- Na_2 ; 0,1 mM DTT, 0,15 M KCl y 25 μl del cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, obteniéndose un sedimento que se resuspendió en 10 ml de la mezcla antes descrita y se almacenó a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Todo el proceso de aislamiento de membranas microsomales se llevó a cabo a $4\text{ }^\circ\text{C}$

2.5.5 Purificación de proteínas

Las proteínas LeNHX etiquetadas con una cola de 10 histidinas (RGS10) se purificaron a partir de microsomas de células transformadas con los genes de tomate, mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni^{2+} .

Para la purificación, las proteínas microsomales se solubilizaron con el detergente Dodecil Maltósido. A 10 ml de fracción microsomal (aproximadamente 80 mg de proteína) se le adicionaron 90 ml de tampón de solubilización (Tabla M13), se agitó durante 30 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$, centrifugándose a continuación a 100000 g durante 30 minutos. Al sobrenadante resultante se le añadió 2 ml de una suspensión de Ni-NTA, dejando la mezcla en agitación suave en un balancín durante toda la noche a $4\text{ }^\circ\text{C}$ para favorecer la unión de las proteínas al Ni^{2+} . Al día siguiente, el

conjunto se transfirió a una columna de polipropileno, con un diámetro de 0,5 cm y se dejó eluir el tampón por gravedad para empaquetar la resina en la columna. Se lavó la columna con 8 ml de cada uno de los tampones de lavado en orden creciente con respecto a la concentración de imidazol (desde 20 a 100 mM) para reducir la unión de proteínas contaminantes a la resina de Ni²⁺ (Tabla M13).

Tabla M13. Soluciones utilizadas para la purificación de proteínas LeNHX por cromatografía de afinidad.

	Tampón de solubilización	Tampón de lavado (20 mM Imidazol)	Tampón de lavado (50 mM Imidazol)	Tampón de lavado (75 mM Imidazol)	Tampón de lavado (100 mM Imidazol)	Tampón de elución
KH ₂ PO ₄ /NaCl pH 6,63	55,5 mM/ 555,5 mM	50 mM/ 500 mM	50 mM/ 500 mM	50 mM/ 500 mM	50 mM/ 500 mM	-----
Imidazol-PO ₄ pH 7,42	11,1 mM	20 mM	50 mM	75 mM	100 mM	500 mM
Glicerol	22 %	10 %	10 %	10 %	10 %	20 %
Dodecil Maltósido	0,55 %	0,075 %	0,075 %	0,075 %	0,075 %	-----
BTP-MES pH 7,5	-----	-----	-----	-----	-----	25 mM
PMSF	-----	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Pepstatina A	-----	3 μM	3 μM	3 μM	3 μM	3 μM
cocktail inhibidor de proteasas	0,2 %	-----	-----	-----	-----	-----

Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con 500 mM de imidazol, en fracciones de 450 μ l. Se comprobó la pureza de las proteínas por electroforesis en SDS-PAGE de alícuotas de 5 μ l de las fracciones recogidas. En general la proteína purificada se eluyó en las fracciones 2, 3 y 4.

2.5.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Se resuspendió de 5 a 25 μ g de proteínas microsomales o de 1 a 5 μ g de proteínas purificadas en 100 mM Tris-HCl pH 8,0 conteniendo SDS al 1%, glicerol al 2%, 10 mM DTT, azul de bromofenol al 0,00125 %, 4 mM PMSF y 100 μ g·ml⁻¹ quimostatina, incubándose la mezcla durante 30 min, a 30 °C. La separación de las proteínas solubilizadas se llevó a cabo en geles 10 % de poliacrilamida utilizando un equipo Mini-Protean-3™ 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 protéico, los geles se tiñeron con Azul Coomassie o *Ruby Protein Gel Stain* (Biorad). Para los estudios de inmunodetección, las proteínas se electrotransfieron desde los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa.

2.5.7. Tinción de proteínas separadas por electroforesis

La visualización de las proteínas separadas por SDS-PAGE se ha llevado a cabo mediante tinción con Azul Coomassie o con el *SYPRO®Ruby Protein Gel Stain* (Biorad). En el caso de tinción con 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 h en agitación, y se destiñeron durante 3-5 h con metanol: ácido acético: agua (40:10:50, v/v/v). En el caso de tinción con *SYPRO*, los geles se fijaron durante 30 minutos en metanol al 10% y ácido acético al 7%, y se tiñeron durante al menos 4 horas en oscuridad con 50 ml de solución de tinción. Tras dos lavados con metanol al 10% y ácido acético al 7% se visualizaron las bandas a la luz ultravioleta.

2.5.8. Electrotransferencia e inmunodetección

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas PVDF (fluoruro de polivinilideno) en un equipo Mini trans-blot de BioRad, a voltaje constante (100V) durante 90 minutos, a 4 °C y utilizando como tampón de transferencia 10 mM CAPS 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 Tween 20 al 0,05%). 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 RGS(H)₄ presente en la cola de histidinas de las proteínas. 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 μ l 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 MgCl₂), 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).

2.5.9. Reconstitución en liposomas

La actividad de los antiportadores purificados se determinó tras reconstituir éstos en membranas artificiales. Para ello, las proteínas purificadas se mezclaron con lípidos (asolectina) y el conjunto se solubilizó con el detergente octil-glucósido. A continuación, el detergente se eliminó por filtración en gel utilizando columnas (*spin-columns*) de Sephadex G-50. Se obtuvieron así proteoliposomas con aproximadamente 50 nm de diámetro, constituidos por una bicapa lipídica en la que están insertadas las proteínas (Venema et al 1992). Para la reconstitución se prepararon dos *spin-columns* utilizando jeringas de 2 ml con lana de vidrio en uno de los extremos. El Sephadex G-50 se hidrató en tampón de reconstitución (10 mM BTP-Mes pH 7,5; 25 mM (NH₄)₂SO₄, glicerol al 20 %) durante al menos 12 horas, y se transfirió a las columnas. Una vez empaquetado el polímero en la columna, ésta se centrifugó durante 5 min a 180 g para eliminar exceso de tampón. Una de las dos columnas se precargó con 2,5 mM piranina-BTP, pH 7,4, en

tampón de reconstitución. Se preparó una suspensión de 30 mg de asolectina (L- α -fosfatidilcolina) en 1 ml de tampón de reconstitución agitando durante 5 min en presencia de Argón para evitar la oxidación de los lípidos. Se mezclaron 5 μ g de proteína purificada, 38 μ l de liposomas (1140 μ g de asolectina), 11 μ l de 25 mM piranina-BTP y tampón de reconstitución hasta un volumen de 104 μ l. Bajo agitación se añadió 5,75 μ l de Octil Glucósido 1M para solubilizar la muestra, dando lugar a la clarificación de la misma. La mezcla solubilizada se cargó en la columna precargada con piranina, y se dejó entrar en la resina por gravedad durante 5 minutos. A continuación, la columna se centrifugó durante 5 min a 180 g. Mientras que la piranina no encapsulada y el detergente se retenían en la parte superior de la columna, los proteoliposomas con piranina encapsulada se recogían en el eluido. Se añadió 100 mg de Biobeads (SM-2; Bio-Rad) en 200 μ l de buffer de reconstitución al eluido y se agitó durante 30 minutos a 4 °C para eliminar restos de detergente. Finalmente, los proteoliposomas se centrifugaron nuevamente a través de la segunda columna de Sephadex G-50, para eliminar restos de piranina no encapsulada.

2.5.10. Medida de la actividad de los antiportadores

La actividad de los transportadores purificados y reconstituidos en liposomas se determinó en base a la velocidad de alcalinización de las vesículas inducida por la adición de cationes monovalentes en el exterior. El pH en el interior de las vesículas se midió con la sonda fluorescente piranina (Acido 8-hidroxi-1,3,6 trisulfónico), encapsulada en los proteoliposomas. Las

medidas se realizaron en un espectrofluorímetro modelo (QM2000, Photon Technology Internacional, Sussex, UK) con agitación y a 25 °C, diluyendo 100 µl de proteoliposomas en tampón de reconstitución en 2 ml de tampón de reacción (20 mM BTP-Mes, glicerol al 10%).

La sonda fluorescente piranina contiene un grupo hidroxilo con un pK de 7,2. La compleja estructura de la molécula de piranina da como resultado un espectro de absorbanza/excitación con diferentes máximos. La fluorescencia a una $\lambda_{\text{excitación}}$ de 404 nm aumenta cuando las vesículas se acidifican, mientras que la fluorescencia a una $\lambda_{\text{excitación}}$ de 463 nm disminuye, con un punto isobéptico a 419 nm (Fig M14). Puesto que I_{404} e I_{463} varían de manera opuesta con respecto a los cambios de pH, la variación de la razón entre estos dos valores de intensidad de fluorescencia (I_{463}/I_{404}) permite una estimación más sensible de los cambios de pH. Además, esta razón solamente depende de las propiedades físicas de la sonda y no de su concentración o de las características del espectrofluorímetro, por lo que proporciona medidas más reproducibles.

La asociación de protones con la piranina depende del pH y se describe con la fórmula:

$$\text{PirH} = (\text{Pir} \cdot \text{H}^+)/K_d \quad (1)$$

donde Pir⁻ y PirH son las concentraciones de las formas ionizadas y protonadas de piranina, respectivamente y K_d la constante de disociación.

La fluorescencia a los $\lambda_{\text{excitación}}$ de 404 y 463 nm depende de la suma de la fluorescencia de las dos formas a de piranina según:

$$F_{404} = C_{\text{pir}^{-404}} \cdot \text{Pir}^{-} + C_{\text{pirH}^{404}} \cdot \text{PirH} \quad (2)$$

$$F_{463} = C_{\text{pir}^{-463}} \cdot \text{Pir}^{-} + C_{\text{pirH}^{463}} \cdot \text{PirH} \quad (3)$$

En que F_{404} y F_{463} es la fluorescencia a una $\lambda_{\text{excitación}}$ de 404 y 463 nm respectivamente, $C_{\text{pir}^{-404}}$ y $C_{\text{pirH}^{404}}$ son coeficientes proporcionales de la fluorescencia a 404 nm de la forma ionizada Pir^{-} y protonada PirH , y $C_{\text{pir}^{-463}}$ y $C_{\text{pirH}^{463}}$ la fluorescencia a 463 nm de la forma ionizada Pir^{-} y protonada PirH . Combinando las ecuaciones 1,2 y 3 e introduciendo la razón de fluorescencia R , F_{463}/F_{404} se llega a la fórmula:

$$H^{+} = K_d \cdot ((R_{\text{max}} - R) / (R - R_{\text{min}})) \cdot (F_{\text{pyr}^{-404}} / F_{\text{pyrH}^{+404}}) \quad (4) \quad (\text{Grynkiewicz et al 1985})$$

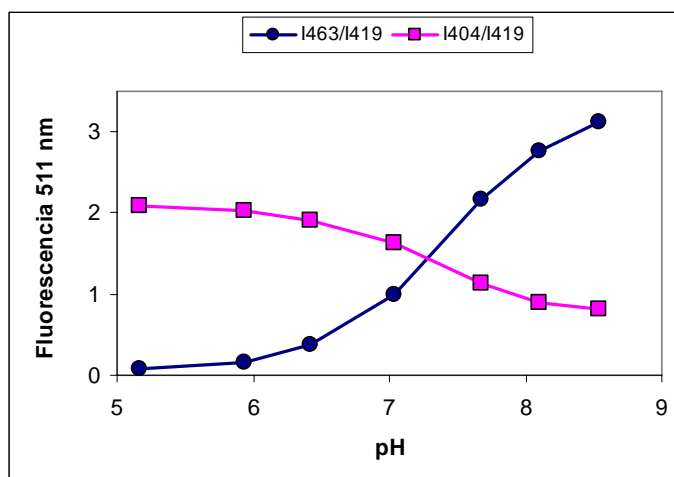
En que R es el valor de la razón de fluorescencia I_{463}/I_{404} , R_{max} es el valor máximo de esta razón en condiciones alcalinas, R_{min} el valor mínimo en condiciones ácidas. La relación entre el pH y la razón de la fluorescencia viene dada por:

$$\text{pH} = \text{pK} + \text{Log}(F_{\text{pyr}^{-404}} / F_{\text{pyrH}^{+404}}) + \text{Log}(R_{\text{max}} - R) / (R - R_{\text{min}})$$

$$\text{pH} = \text{pK}' + \text{Log}(R_{\text{max}} - R) / (R - R_{\text{min}})$$

Esta última ecuación demuestra que el pH y el logaritmo de $(R_{\max}-R)/(R-R_{\min})$ tienen una relación lineal con pendiente 1. Experimentalmente se observa que este valor está en relación lineal con el pH a valores de 5,5 a 7,5 (Fig M14 B).

A



B

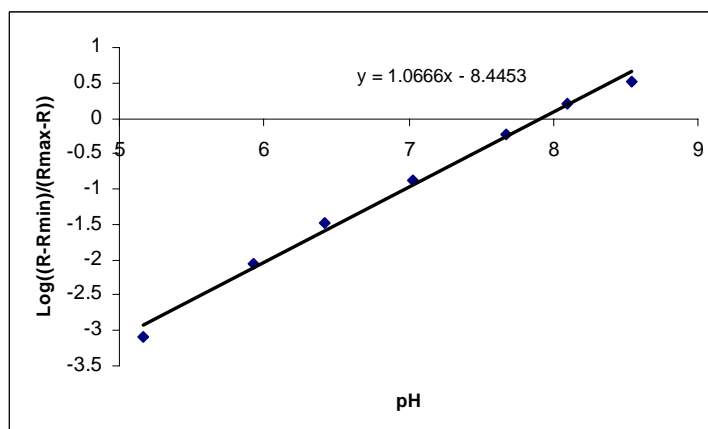


Fig M14. Relación entre la fluorescencia de la piranina y el pH (0,25 μ M piranina en 20 mM BTP-MES y glicerol al 10%). La emisión de fluorescencia se midió a 511 nm. En A se muestra el valor de la fluorescencia en función del pH a 404 nm y a 463 nm, dividido por el valor obtenido a 419 nm (punto isobéptico). En B se muestra la relación lineal entre el logaritmo de $(R-R_{\min})/(R_{\max}-R)$ y el pH.

Para estimar el pH en el interior de las vesículas a partir de la fluorescencia de la piranina, se equilibró el pH del interior de las vesículas con el pH del medio de reacción (BTP-Mes 20 mM, glicerol 10%). En este caso los proteoliposomas se diluyeron en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para evitar un desequilibrio entre pH interior y exterior de las vesículas y se añadió el ionóforo gramicidina ($1 \mu\text{M}$) para facilitar un ajuste rápido de las concentraciones iónicas y del pH entre el interior y el exterior. Posteriormente, se modificó el pH del medio añadiendo alícuotas concentradas de H_2SO_4 o NaOH para determinar R_{max} y R_{min} , permitiendo el cálculo del pH en los proteoliposomas a partir de la razón de fluorescencia a 404 y 463 nm.

Originalmente, en el ensayo de la actividad antiporte catión/protón se utilizaba la actividad H^+ -ATPasa para acidificar el interior de las vesículas, creando un gradiente de protones que energiza la reacción de intercambio catión/protón llevada a cabo por los antiportadores. Para aproximarnos a esta situación utilizamos el método del *acid load*, basado en la dilución de una base débil como el NH_3 . Para crear un pH ácido en el interior de los proteoliposomas sin cambiar el pH del medio exterior, se prepararon estos proteoliposomas en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Puesto que el NH_3 es libremente permeable a través de la membrana lipídica, mientras que el NH_4^+ es impermeable, la dilución de los proteoliposomas en un medio sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ provoca un eflujo de NH_3 hacia el exterior, hasta que las concentraciones de NH_3 en el exterior e interior se equilibran. El eflujo de NH_3 provoca un nuevo equilibrio entre NH_4^+ y NH_3 acorde con su constante de disociación, donde la

desaparición de NH_3 se compensa con un aumento de la concentración de H^+ y una disminución de NH_4^+ .

La Figura M15 muestra el espectro de excitación con emisión a 511 nm obtenido diluyendo los proteoliposomas en ausencia (curva a) o presencia (curva b) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

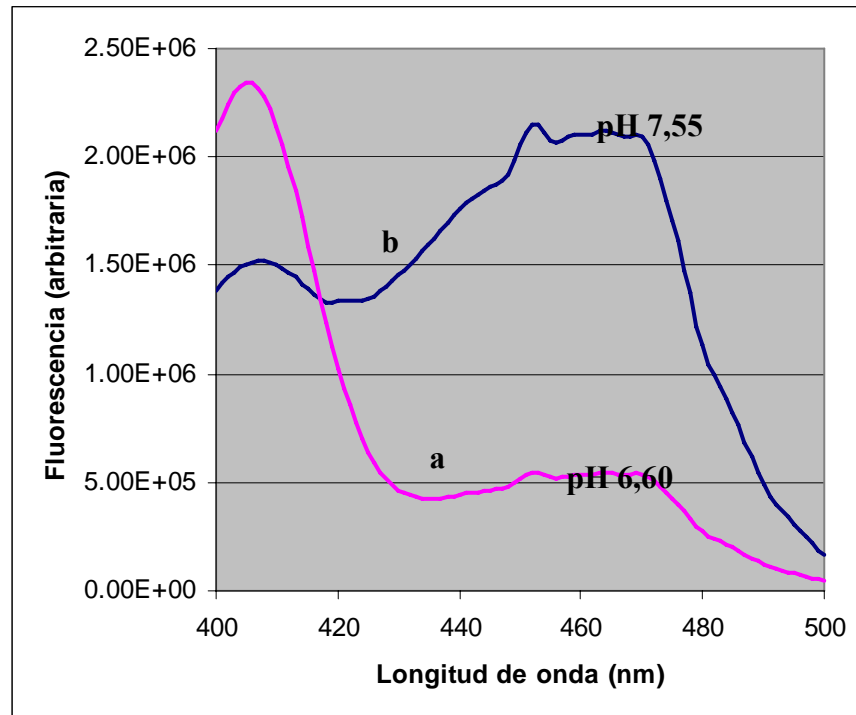


Fig. M15. Espectro de excitación de piranina (emisión a 511 nm) encapsulada en proteoliposomas diluidos en ausencia (a) o presencia (b) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el medio externo. La dilución sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ provoca una acidificación del interior de las vesículas.

La calibración de la señal de fluorescencia indica que el pH en el interior de las vesículas es 7,55 cuando no se aplica un gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (curva b), y de 6,60 cuando se diluyen los proteoliposomas 20 veces en un medio sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fig. M15).

Para iniciar la reacción de antiporte se añadieron sales de cloruro de diferentes cationes, y se evaluó el aumento de pH intravesicular con el tiempo ($\Delta\text{pH}/\Delta t$), como medida del flujo de protones catalizado por los antiportadores. La actividad antiporte se calculó a partir de los cambios iniciales en este valor. El flujo neto de protones $J_{\text{H}^+_{\text{net}}}$ se determinó como:

$$J_{\text{H}^+_{\text{net}}} = B \cdot (V/A) \cdot d\text{pH}/dt \text{ (Rossignol et al 1982)}$$

Donde B es el *Buffer Strength* al pH de medida, y V y A el volumen y área de los proteoliposomas. Por esta razón, la variación inicial de pH ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) está linealmente relacionada con el flujo de protones. Como la variación inicial de $\log(I_{463}/I_{404})$ es proporcional a la variación del pH, la determinación del valor de $\log(I_{463}/I_{404})$ proporciona la posibilidad de evaluar las actividades de los antiportadores sin necesidad de calibrar la señal con el pH.

Para evaluar la especificidad de la reacción de antiporte se añadieron sales de K^+ , Na^+ , Cs^+ y Rb^+ . Como control negativo se utilizó el catión orgánico tetrametil amonio (TMA^+), ya que es poco probable que el antiportador pueda transportar este ión. Para evaluar la afinidad de los antiportadores para el Na^+ o K^+ utilizamos distintas concentraciones de sales

de K^+ o Na^+ . Al final de la reacción se eliminó el gradiente de protones añadiendo sulfato de amonio.

2.6. Localización subcelular

La localización subcelular de las proteínas LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4 se ha determinado mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal en células de epidermis de cebolla transformadas de forma transitoria con estos genes de tomate. Se utilizaron cuatro construcciones: LeNHX2 clonado en pGreen-35S, LeNHX3 y LeNHX4 clonados en p2GWF7,0 y LeNHX4 clonado en p2FGW7,0.

La transformación transitoria de las células de epidermis de cebolla se realizó mediante biobalística, por bombardeo de las mismas con partículas de oro que en su superficie tenían adheridas las construcciones génicas para la sobreexpresión de LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4.

2.6.1. Preparación de las partículas de oro, del ADN y del tejido vegetal

La preparación del stock de partículas de oro se llevó a cabo siguiendo el método de Kikkert (1993) con algunas modificaciones. En tubos eppendorf a los que las partículas se adherían bien (TeknoKrama Ref. 7246.901) se introdujeron 60 mg de partículas de oro y se añadió 1 ml de etanol al 70 %. Se agitó 10 minutos y se mantuvo a continuación 15 minutos sin agitación a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 minuto a 9500 g en centrifuga de mesa y se lavó dos veces con 1 ml de agua estéril, dejando decantar entre los

lavados y centrifugando 1 min a 9500 g. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de glicerol al 50 % estéril. La concentración final se ajustó aproximadamente a 60 mg/ml y se almacenó a 4 °C. Antes del primer disparo se sonicaron las partículas de oro durante 3 minutos con el fin de evitar la formación de grumos.

Se partió de células de *E. coli* transformadas con los vectores mencionados, que se cultivaron en 50 ml de medio LB durante toda la noche a 37 °C y agitación de 300 rpm. Tras recoger las células por centrifugación (5 minutos a 2500 g), se extrajo el ADN utilizando para ello el sistema *Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit* (Biorad). El ADN se eluyó de la columna en dos pasos: el primero con 250 µl y, el segundo, con 350 µl de agua destilada.

Se utilizó aproximadamente 8 µg de ADN en 20 µl de agua destilada y se adicionó 30 µl de partículas de oro, previamente sonicadas durante 3 minutos. Tras agitar durante 10 seg, se adicionó 50 µl de 2,5 M CaCl₂ y se volvió a agitar. Seguidamente, se adicionó 20 µl de 0,1 M espermidina, volviéndose a agitar durante 30 seg. El conjunto se incubó en hielo 15 minutos, aplicándose posteriormente un pulso rápido de centrifugación. Al sedimento resultante se le añadieron 500 µl de etanol, se agitó la mezcla durante 30 segundos y seguidamente se incubó en hielo durante 5 minutos. Tras un pulso de centrifugación, se obtuvo un sedimento al que se adicionó 200 µl de etanol, repitiéndose la incubación en hielo y el pulso de centrifugación. Finalmente se obtuvo un sedimento que se resuspendió en 30 µl de etanol, manteniéndose en hielo hasta su uso.

Para la transformación se utilizaron cebollas grandes y frescas, preferentemente la capa central. Con un bisturí estéril se cortó una capa cuadrada de unos 4 centímetros de lado, que a su vez se dividió en 4 partes iguales. Con ayuda de una pinza millipore se retiró un cuadrado de aproximadamente 2 centímetros de lado, que se colocó en una placa con medio MS conteniendo 2 % de sacarosa.

2.6.2. Bombardeo y microscopía de fluorescencia/confocal

Se utilizó un sistema *Biolistic PDS-1000-HE* (BioRad, Munich, Alemania), en el que se fijaron los siguientes parámetros: discos de ruptura de 1100 psi de presión, 8 mm de distancia a los *microcarriers*, 6 mm de distancia a la pantalla de parada (*stopping screen*); 6 cm de distancia al tejido diana. Se realizaron un total de cuatro disparos para cada construcción. Después de bombardear se sellaron con parafilm las placas con medio MS donde se había situado el tejido vegetal y se incubaron de 24 a 36 horas a 28 °C en oscuridad.

Para visualizar la expresión transitoria de LeNHX3 y LeNHX4 se usó un microscopio Zeiss Axioskop (Zeiss, Hamburg, Germany) equipado con un *set* de filtros GFP (excitación BP 450-490, Dicroico FT 510, emisión LP 515) y un *set* de filtros RFP (excitación BP 546/12, Dicroico FT 580, emisión LP 590). Para visualizar la expresión transitoria de LeNHX2 se usó un microscopio láser confocal Leica TCS SL DMRE (Leica, Wetzlar, Alemania). Se obtuvieron secciones ópticas de 0,5-2 μm . Las señales de fluorescencia verde fueron obtenidas usando una línea láser de excitación de 488 nm con señales de

emisión recogidas a 525 ± 50 nm. Las señales de fluorescencia roja fueron obtenidas usando una línea láser de excitación de 543 nm con señales de emisión recogidas a 580 ± 50 nm.

2.7. Caracterización del antiportador LeNHX2 mediante sobreexpresión en plantas de Arabidopsis

Las semillas obtenidas de las plantas transgénicas fueron escrutadas *in vitro* en medio MS suplementado con 50 mg.l^{-1} de higromicina. Para los diferentes estudios realizados en este trabajo se utilizaron tres líneas homocigóticas de la progenie T3 portadoras de una única inserción del transgen. Ello se determinó en base al estudio de la segregación de la resistencia a higromicina y al análisis por PCR.

2.7.1. Análisis de la presencia del transgen por PCR

La presencia de LeNHX2 en las plantas de Arabidopsis transformadas se determinó mediante PCR, utilizando ADN genómico extraído según se ha indicado en el apartado 2.1.18 y cebadores específicos de LeNHX2 (5'-CCT TTG AGG GGA ACA ATG G-3' y 5'-CAT CTT CAT CTT CGT CTC C-3'), según se ha descrito en el apartado 2.1.1.

2.7.2. Análisis de fenotipos

Los fenotipos de las plantas transgénicas se evaluaron en las líneas 317, 243 y 357. Para cada línea se tomaron azar 5 plantas por cada uno de los tratamientos salinos o de deficiencia en K y se determinaron los pesos fresco y seco de raíz y parte aérea. Para la determinación del peso seco, la raíz y parte aérea de las plantas se secó en estufa a 80 °C durante 48 h.

2.7.3. Obtención de microsomas

Se obtuvieron microsomas de raíz y parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* control y transformadas. El material vegetal se homogenizó en mortero a razón de 4 ml tampón de homogenización por g de peso fresco. Dicho tampón contenía 0,5 M sorbitol, 50 mM MOPS-KOH pH 7,6, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, PVP 40000 al 1,5%, BSA al 0,5 %, 1 mM PMSF y 1 mM DTT. El homogenado obtenido se filtró a través de 4 capas de gasa y el extracto resultante se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos, obteniéndose un sobrenadante que se centrifugó a 120000 g durante 35 minutos. El sedimento resultante, correspondiente a la fracción microsomal, se resuspendió en tampón de conservación (sacarosa al 15 %, 10 mM Tris-Mes pH 7,6, 1 mM EGTA, 25 mM KCl, 1,1 M glicerol, BSA al 0,2 %, 2 mM DTT, 1 mM PMSF y 1 mg/l leupeptina y se congeló en nitrógeno líquido, siendo posteriormente almacenado a -80 °C. Todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C (Fig. M16).

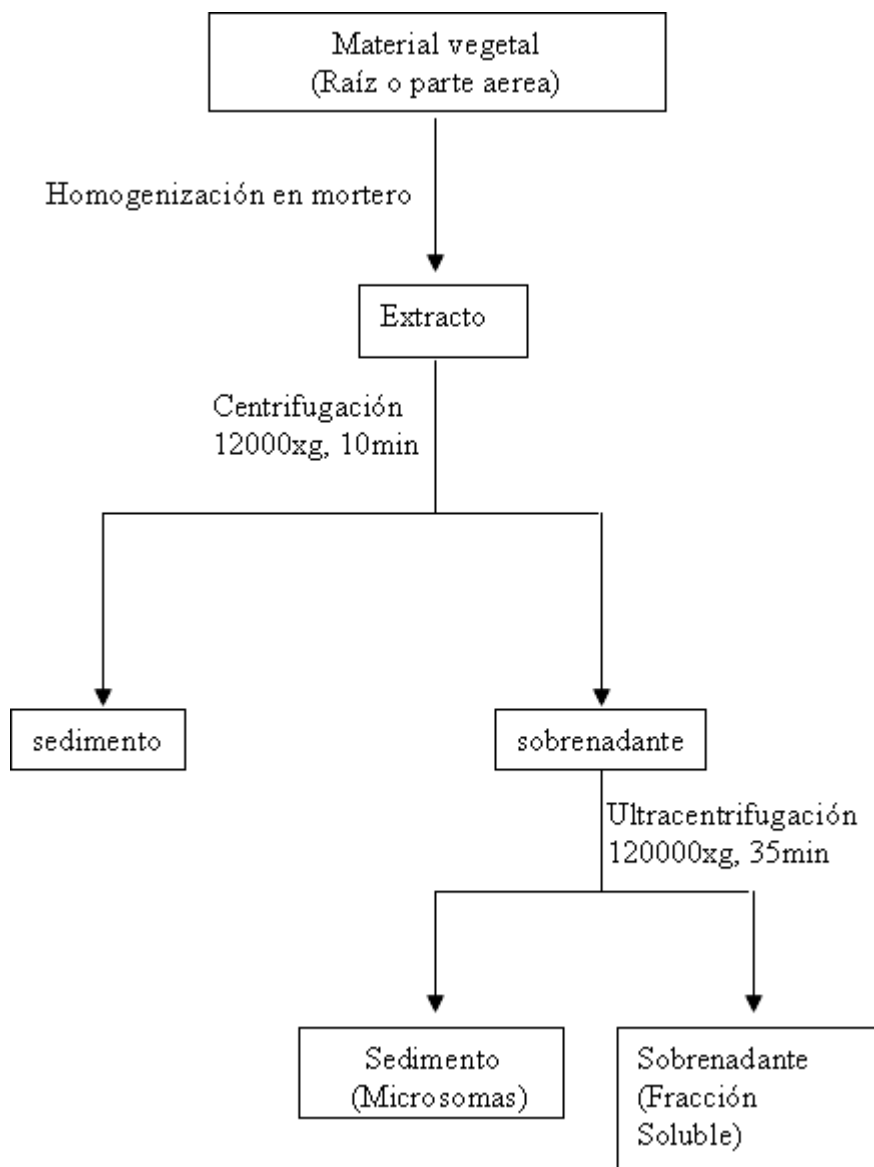


Fig. M16. Esquema de la metodología seguida para la obtención de membranas microsomas de raíz y parte aérea de Arabidopsis.

2.7.4. Purificación de LeNHX2 a partir de las membranas microsomales e inmunodetección

La proteína LeNHX2 fue parcialmente purificada a partir de la fracción microsomal de raíz y parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* control y transformadas por cromatografía de afinidad en columna de Ni²⁺, según se ha descrito en el apartado 2.5.5, pero con algunas modificaciones. Brevemente, una alícuota de 1 mg de proteína de membrana resuspendida en 2 ml de 100 mM Tris-HCl pH 7,5, glicerol al 20 %, 0,1 mM DTT y 0,1 mM EDTA, se mezcló con 20 ml de tampón de solubilización compuesto por 50 mM KH₂PO₄ pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol , glicerol al 20%, N-dodecil-β-D-maltósido al 0,5% y 40 μl de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma P8849), incubándose la mezcla 30 minutos a 4 °C en agitación. El material insoluble fue eliminado por centrifugación a 30000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se mezcló con 100 μl de resina Ni-NTA (Qiagen, Chatsworth, CA, USA), incubándose toda la noche a 4 °C. La resina fue después vertida dentro de una pipeta Pasteur sellada con lana de vidrio en el extremo más fino y prelavada con un gradiente de imidazol en fracciones de 400 μl conteniendo 20, 50, 75 y 100 mM de imidazol, pH 7,4, en 50 mM KH₂PO₄ pH 7,4, 500 mM NaCl, glicerol al 10%, n-dodecil-β-D-maltósido al 0,075%, 2 μg/ml pepstatina y 0,2 mM PMSF. La proteína fue eluída lentamente en 400 μl de 20 mM BTP-MES pH 7,4, 500 mM imidazol pH 7,4, glicerol al 10%, 2 μg/ml pepstatina y 0,2 mM PMSF. Para comprobar la presencia de LeNHX2 en el eluido se realizó una electroforesis en gel de

poliacrilamida con la fracción recogida, en las condiciones descritas en el apartado 2.5.6 y se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína, según se ha descrito en el apartado 2.5.7, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo RGS4.

2.7.5. Aislamiento de endomembranas en colchón de sacarosa

Las membranas intracelulares se aislaron a partir de microsomas de plantas de *Arabidopsis* que sobrepresaban LeNHX2. Se preparó un colchón de sacarosa constituido por 15 ml de sacarosa 35 % (p/p) en 10 mM Tris-Mes pH 7,6, 1 mM EGTA, 25 mM KCl, 1,1 M glicerol, 0,2 % BSA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF y 1 mg/l leupeptina. Sobre este colchón se depositaron aproximadamente 10 mg de proteína microsomal resuspendida en 2 ml de de sacarosa 15 % (p/p) en el tampón anteriormente descrito 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 150000 g durante 30 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, posteriormente, a -80°C hasta su uso.

2.7.6. Medidas de la actividad antiportadora en vesículas endosomales

La actividad antiportadora fue ensayada monitorizando la relajación de un gradiente de pH preestablecido creado por la acción de la V-H⁺ATPasa

en la membrana de las vesículas. Para ello, se resuspendió 100 μg de proteína de membrana en 2 ml de medio de reacción, constituido por 5 mM BTP-Mes pH 7,5, 50 mM TMA-Cl, 1 mM ATP-BTP pH 7,5, 300 mM Sorbitol y 1 μM ACMA. La reacción se inició con la adicción de 3 mM MgSO_4 al medio, lo que resultó en la extinción de la fluorescencia del ACMA, debido a la generación de un gradiente de pH (ácido en el interior) por la actividad H^+ -ATPasa. Cuando el nivel de fluorescencia se estabilizó, se inició la reacción de antiporte mediante adicción de 50 mM K_2SO_4 o Na_2SO_4 al medio, dando lugar a la recuperación de la fluorescencia debido a la relajación del gradiente de pH como resultado del intercambio catión/protón. Al final del experimento se disipó el gradiente de pH por adicción de 0,5 μM Nigericina, ionóforo intercambiador de K^+ y H^+ o 0,5 μM Monensina, ionóforo intercambiador de Na^+ y H^+ . Las reacciones se llevaron a cabo en cubetas desechables para evitar la contaminación con los ionóforos. El total de fluorescencia recuperada, medida como la diferencia entre la fluorescencia mínima y el nivel final de fluorescencia obtenido tras la adicción de ionóforos, se estableció como 100% de fluorescencia. La fluorescencia fue monitorizada en una célula termoestable a 27 °C. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 415 y 485 nm, respectivamente.

2.8. Caracterización del antiportador LeNHX2 mediante silenciamiento génico en tomate

Los sistemas de silenciamiento génico o interferencia por ARN (RNAi) son mecanismos de control de la expresión génica que están presentes en todos los organismos eucariotas. Distinguimos dos clases de silenciamiento génico, el silenciamiento génico transcripcional (TGS) asociado a la regulación de transposones mediada por la metilación del ADN en el núcleo, y el silenciamiento génico post-transcripcional asociado a la regulación de la infección vírica mediante la producción de ARN de doble cadena en el citoplasma (Vaucheret et al 2001). En un principio se consideraban dos rutas separadas e independientes, pero posteriormente se demostró que constituyen dos vías alternativas, aunque no excluyentes, de respuesta frente a dos factores de estrés que afectan al genoma de las plantas: la integración estable de un ADN foráneo en el ADN de la planta y la replicación extracromosómica de un genoma viral.

En este trabajo hemos llevado a cabo el silenciamiento génico post-transcripcional de LeNHX2, el cual debe reducir sustancialmente la acumulación de mRNA sin afectar a la transcripción (Vaucheret et al 2001).

Se han utilizando construcciones hpRNA (*self-complementary hairpin*), compuestas por un promotor y un terminador entre los que se inserta una secuencia del gen diana inversamente repetida, de forma que el ARN

transcrito híbrida consigo mismo formando una estructura en horquilla (Watson et al 2005). Se ha comprobado que usando este tipo de construcciones con brazos sentido y antisentido de 98-853 nucleótidos, es posible silenciar genes en un gran número de especies vegetales (Wesley et al 2001). Además, se ha demostrado que la introducción de un intrón (ihpRNA) entre las secuencias inversamente repetidas, provoca un aumento en el efecto de silenciamiento.

Mediante el uso de ihpRNA se obtienen una serie de transformantes, de los cuales algunos presentan un completo *Knock-out* del gen diana endógeno, y otros presentan niveles de expresión muy reducidos pero detectables.

2.8.1. Análisis de la presencia del transgen por PCR

Para comprobar la presencia de la construcción para el silenciamiento génico de LeNHX2, las 44 plantas de tomate regeneradas a partir de los explantos de cotiledón transformados fueron analizadas por PCR. Para este análisis se utilizó una pareja de cebadores específicos del plásmido pKANNIBAL (5'-CTT CAT TTC ATT TCC ACA-3', 5'- CCT CTT ACA CAT CAT CAC TTC-3') que se unen a ambos lados del inserto y amplifican un fragmento de 839 pares de bases.

2.8.3. Análisis del nivel de silenciamiento

Para el análisis del nivel de silenciamiento se llevo a cabo primero una extracción de ARN tanto de plantas silenciadas como de plantas no

silenciadas según se ha descrito en el apartado 2.2.1. A continuación, se realizó una RT-PCR utilizando *enhanced avian HS RT-PCR kit* (Sigma) según el protocolo descrito en el apartado 2.4.2. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de PCR a tiempo real de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 2.4.1., utilizando 1 µl de cDNA de una dilución 1/10 para el gen problema y 1/100 para el gen de referencia y cebadores específicos (Tabla M14). Como gen de referencia se usó el ribosómico 18S.

Tabla M14. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR a tiempo real para cuantificar el nivel de silenciamiento del LeNHX2.

PRIMERS	SECUENCIA
LeNHX2 forward	5'-CCTTTGAGGGGAACAATGG-3'
LeNHX2 reverse	5'-CATCTTCATCTTCGTCTCC-3'
18S forward	5'-AAAAGGTCGAGCGGGCT-3'
18s reverse	5'-CGACAGAAGGGACGAGAC-3

2.8.2. Análisis de fenotipos

La evaluación de fenotipos en plantas silenciadas de tomate se llevó a cabo en plantas T0 y T1 de las líneas 7, 11, 12, 14 y 44. En el caso de las plantas T1 el análisis consistió en la determinación de los pesos fresco y seco de raíces, tallos y hojas de plantas cultivadas en sistemas hidropónicos en presencia de 130 mM NaCl (apartado 1.3.6). Para la determinación de los pesos secos se procedió como se ha indicado en el apartado 2.7.2.

Resultados

Estudios previos realizados por investigadores del laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo habían permitido la identificación de los genes LeNHX1 y LeNHX2 de tomate y su posterior caracterización mediante expresión heteróloga en levadura (Venema et al, 2003). Sin embargo, estas isoformas no constituyen los verdaderos ortólogos de la isoforma AtNHX1, un antiportador (Na⁺,K⁺)/H⁺ vacuolar, implicado en la resistencia a sal y acumulación de Na⁺ en vacuolas (Apse et al 1999, Venema et al 2002). Por esta razón, hemos continuado identificando isoformas de la familia NHX de tomate y caracterizando los nuevos antiportadores. Por otra parte, hemos profundizado en la caracterización funcional del transportador LeNHX2 mediante sobreexpresión en Arabidopsis y silenciamiento génico en tomate.

1. Identificación de fragmentos de cDNA de tomate que codifican transportadores iónicos de la familia NHX.

Se utilizó la base de datos del *Institute for Genomic Research* (Rockville, MD) (<http://www.tigr.org>) para buscar ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de tomate con homología a antiportadores de tipo NHX, partiendo para ello de las secuencias de AtNHX1-6, así como de las de LeNHX1 y LeNHX2 anteriormente identificadas en nuestro laboratorio. Estos EST representan secuencias parciales de cDNA, obtenidos a partir de la secuenciación a gran escala de clones individuales de genotecas construidas a partir de cDNA. Mediante el programa BLASTX (<http://ebi.ac.uk>), que compara secuencias de

aminoácidos con secuencias de nucleótidos traducidos en todos los cuadros de lectura posible, se identificaron los ESTs EST554564, EST405060 y EST553877, con homología a las proteínas NHX (Tabla R1).

Tabla R1. Características de los EST con homología a los antiportadores AtNHX1-6, LeNHX1 y LeNHX2.

EST	Clon	Vector	Genebank nº acc	Pares de Bases	Tejido
405060	cLEGG9M8	pBluescriptSKmCUadapt	BE433982	969	Pericarpo de fruto de tomate
553877	cTOD18B1 3	pBluescript SK(-)	BI933988	877	Flores de tomate en el estadio de la anthesis
554564	cTOD20F15	pBluescript SK(-)	BI934675	670	Flores de tomate en el estadio de la anthesis

1.1. Obtención de cDNAs completos

Los clones de bacterias portando los cDNAs se obtuvieron de *Clemson University*. En la secuencia EST554564 se pudo identificar la región 5' conteniendo la metionina de iniciación, pero faltaba la región 3'. Puesto que los cDNA's se construyen a partir de la región 3', la presencia de la región 5' en el EST hacía probable que el clon CTOD20F15 portando el vector con el cDNA de este EST contuviera el cDNA completo. Sin embargo, no se consiguió cultivar las bacterias portando este vector por lo cual fue imposible

aislar y secuenciar el inserto. Estos resultados indican que la expresión de esta isoforma resulta tóxica en bacterias, lo que ya se ha observado para otros sistemas de transporte de plantas y en especial para los antiportadores NHX y SOS de *Arabidopsis* (FJ Quintero y JM Pardo, comunicación personal). Por esta razón, se determinó la secuencia 3' por PCR interna o anidada utilizando una genoteca de pelos radiculares, como se ha descrito en el apartado 2.2.3.1 de Material y Métodos.

De los clones cTOD18B13 y cLEGG9M8 pudimos aislar los plásmidos portando los ESTs y secuenciarlos. En el EST 553877 estaba presente la región 3', pero no la 5'; mientras que el EST 405060 no contenía ni la región 3' ni la 5'. Sin embargo, estas secuencias no se detectaron en la genoteca de pelos radiculares de tomate, indicando que los genes correspondientes no se expresan en pelos radiculares. Por esta razón, ya que los ESTs representaban secuencias obtenidas de genotecas de flor y fruto de tomate identificamos la secuencia de la región 5' del cDNA correspondiente a EST553877 y las regiones 5' y 3' del cDNA correspondiente al EST405060 por RACE 5' y RACE 3' utilizando ARN aislado de flores de tomate.

Los cebadores específicos para obtener las secuencias completas de los cDNAs se muestran en el Anexo I.

Hemos denominado LeNHX3 a la secuencia obtenida a partir de EST554564. Después de la secuenciación completa de los genes observamos que EST553877 y EST405060 representan ESTs de distintas regiones del mismo gen, que hemos denominado LeNHX4.

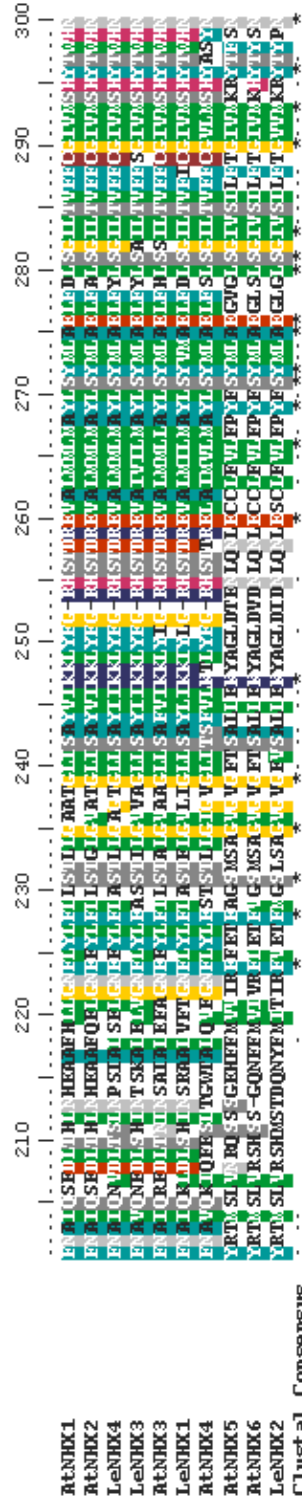
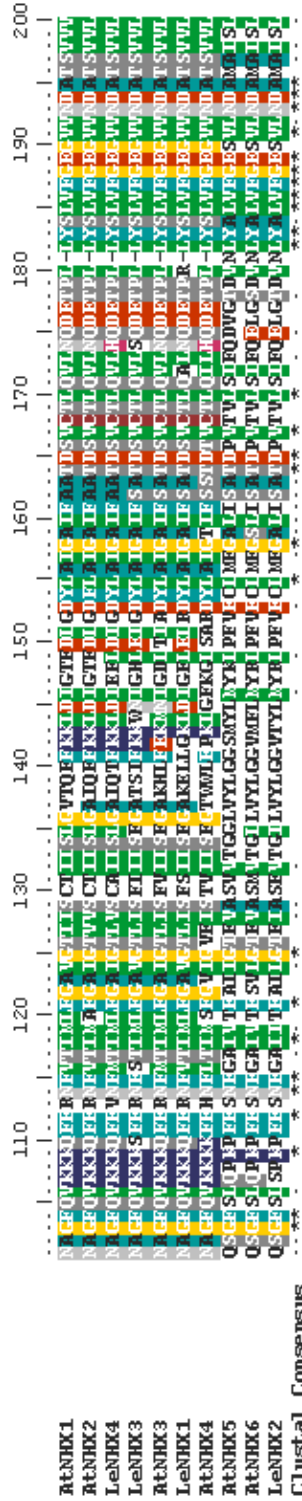
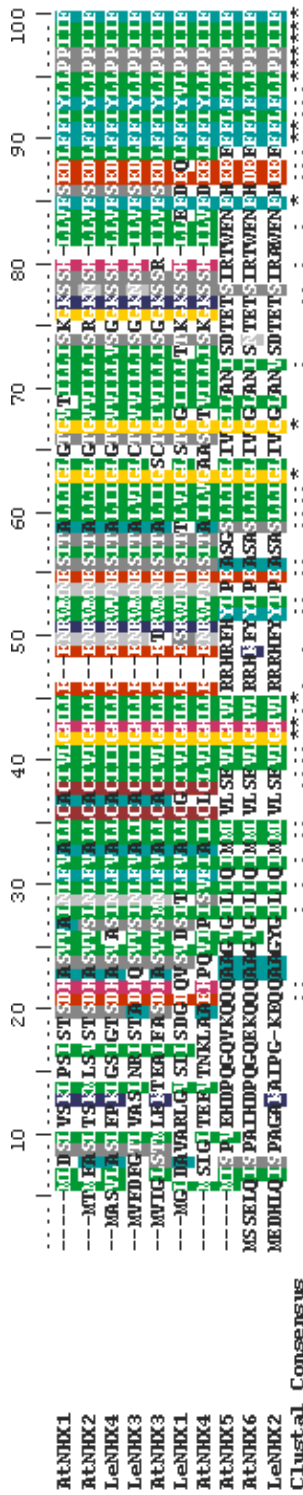
Los ensayos funcionales con estos cDNAs, tanto los de complementación en levadura, como los ensayos bioquímicos de la actividad de las proteínas, realizados como se ha descrito en los apartados 2.5.3 y 2.5.10 de Material y Métodos, indicaban que las proteínas eran poco activas. Además, no se consiguió determinar para algunos LeNHX la localización subcelular de las proteínas de fusión con GFP en células de epidermis de cebolla (Apartado 6 de Resultados). La baja actividad y las dificultades para localizar las proteínas podrían ser debidas a errores en las secuencias obtenidas, un problema que ha sido observado también con otros antiportadores Na^+/H^+ de plantas como AtNHX1, AtSOS1 (FJ Quintero y JM Pardo, comunicación personal) y SISOS1 (A Belver, comunicación personal). La expresión de estos genes en bacterias resulta altamente tóxica y es posible que, a pesar de utilizar plásmidos en que la expresión de los genes está reprimida, en las bacterias se produzcan niveles bajos de expresión durante el proceso de clonación, dando lugar a mutaciones en los cDNAs. Por esta razón hemos clonado 4 copias independientes del cDNA de LeNHX4. Basándonos en una secuencia consenso y comparando la traducción a aminoácidos con otros antiportadores NHX de plantas, hemos determinado la secuencia correcta. Hemos reconstruido esta secuencia correcta combinando secuencias parciales de dos clones independientes cortando con enzimas de restricción adecuadas y ligando los fragmentos. El cDNA de LeNHX3 ha sido clonado dos veces a partir de la genoteca de pelos radiculares, dando la misma secuencia en las dos ocasiones. Sin embargo, es

posible que en el cDNA presente en la genoteca se hayan introducido mutaciones durante el proceso de construcción de la genoteca.

Las secuencias completas de los genes y de los ESTs con su traducción a secuencias aminoacídicas, así como los cebadores utilizados en las reacciones 3'RACE, 5'RACE y PCR anidada se adjuntan en el Anexo I.

Los cDNAs de LeNHX3 y LeNHX4 codifican proteínas de 537 y 536 aminoácidos respectivamente, y tienen todas las características de antiportadores tipo NHX (Fig. R1). Los genes clonados en este estudio codifican proteínas que son más cercanas a las proteínas AtNHX1 y 2, y podrían constituir antiportadores (Na⁺,K⁺)/H⁺ vacuolares en analogía a la función descrita para AtNHX1 y AtNHX2 (Fig. R2) (Venema et al. 2002, Yokoi et al. 2003).

Fig. R1. (Página siguiente) Alineamiento de las secuencias de los antiportadores NHX de Arabidopsis y tomate. Las secuencias de las proteínas NHX de tomate y Arabidopsis se alinearon utilizando el programa ClustalX 1.5b. Todas las secuencias contienen la región conservada LY-LVFGE-V-NDA con un aspartato posiblemente implicado en el transporte del catión y la región FF---LPPIIF implicada en la inhibición de estos antiportadores por amilorida.



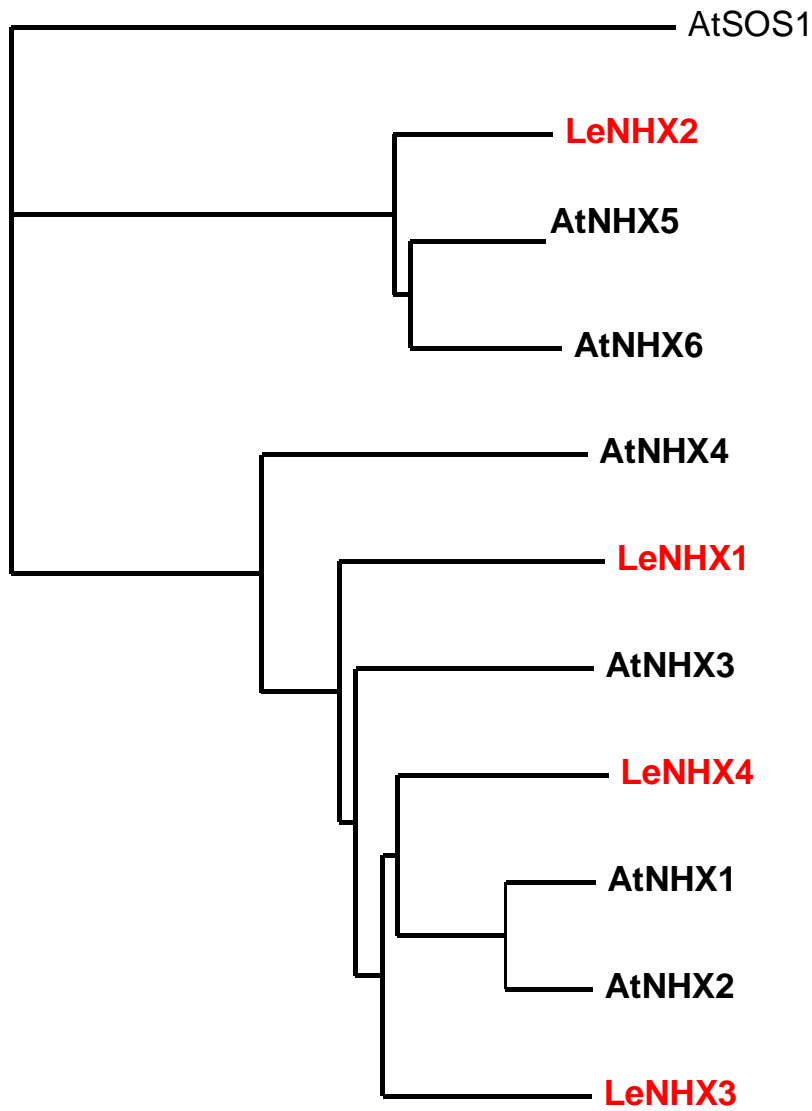


Fig R2. Árbol filogenético de los antiportadores NHX de Arabidopsis y tomate. El análisis filogenético se realizó con los programas PROTDIST y NEIGHBOR de Phylip, utilizando la secuencia de AtSOS1 con poca homología a las secuencias NHX como *outgroup*. La visualización se realizó con el programa TreeView.

2. Estudio de la expresión de los transportadores NHX de tomate

2.1. Análisis de la expresión de genes LeNHX en distintos tejidos de la planta

Se aisló ARN de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L, cultivar PE-73) como se ha descrito en el apartado 2.2.1 de Material y Métodos. Para determinar los niveles de expresión de los genes LeNHXs en raíces, tallos, hojas, flores y frutos se realizó primero una RT-PCR a partir del ARN aislado, utilizando el kit “Enhanced Avian HS RT-PCR” (Sigma) y, posteriormente, una PCR con el cDNA obtenido, utilizando los cebadores descritos en la Tabla M11 (capítulo de Material y Métodos). Los resultados se muestran la Fig. R3.

Los mayores niveles de expresión correspondieron al gen LeNHX3. Mientras que LeNHX1, 2 y 3 se expresaban en todos los órganos de la planta estudiados, LeNHX4 se expresaba mayoritariamente en flor y fruto y era apenas perceptible en raíz, lo que explica la no detección del cDNA correspondiente a este gen en la genoteca de pelos radiculares utilizada en este trabajo.

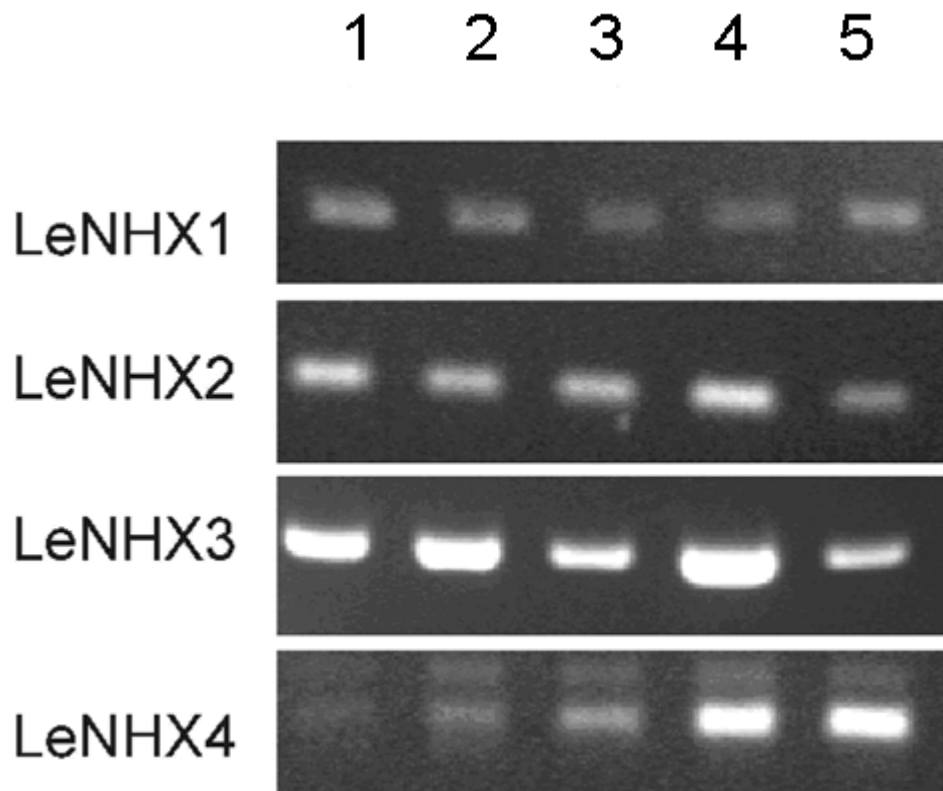


Fig. R3. Expresión de antiportadores NHXs de tomate en distintos tejidos. 1- Raíces, 2-Tallos, 3- Hojas, 4-Flores y 5-Frutos.

2.2. Expresión de genes NHXs en cultivares de tomate con distinta tolerancia al NaCl en respuesta a estrés salino y relación con contenido iónico.

La existencia de cultivares de la especie *Solanum lycopersicum* y de especies silvestres de tomate como *Solanum pimpinellifolium* con distinto grado de tolerancia a la salinidad está bien documentada en la bibliografía

(Nuez et al 1995, Bolarín et al 2001, Balibrea et al 2003, Cuartero 2006, Villalta et al 2008). En general, las especies tolerantes tienen mayor capacidad que las sensibles para acumular sodio y mantener altos niveles intracelulares de K^+ . Se ha demostrado que los antiportadores vacuolares NHX juegan un papel en la acumulación de Na^+ en respuesta a estrés salino (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 2006; 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; Shi et al 2008; Zhang et al 2008), lo que sugiere que la expresión diferencial de estos antiportadores podría estar relacionada con la diferente tolerancia a la salinidad observada entre especies y cultivares de tomate. Por ello hemos comparado el efecto del estrés salino sobre el patrón de expresión de genes NHXs en *Solanum pimpinelifolium*, una especie silvestre y tolerante a la salinidad y *S lycopersicon* cv. Volgogradskij, una especie sensible. Estudios de diferentes investigadores, comparando estas dos especies, han demostrado que la especie silvestre tolerante acumula más Na^+ , sobre todo en hojas, con poco efecto sobre los niveles de K^+ , que eran más altos en la especie sensible (Nuez, 1995; Guerrier 1996).

Las plantas de tomate, cultivadas durante tres semanas en un sistema hidropónico, se sometieron a dos tratamientos salinos (Apartado 1.3.6. de Material y Métodos) y se determinaron los pesos fresco y seco y el contenido iónico en raíz, tallo y hojas.

En la Fig. R4 y en la Tabla R2 se observa que la inhibición del crecimiento provocada por 130 mM NaCl era mayor en la especie sensible que en la tolerante al NaCl.

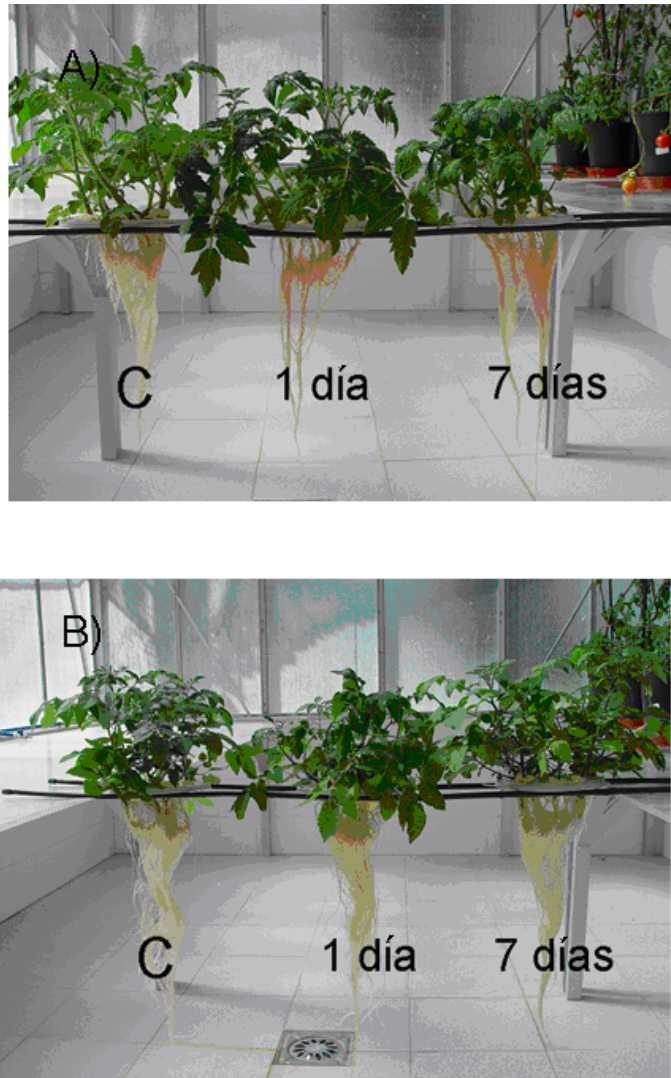


Fig. R4. Plantas de *S. lycopersicum* cv. volgo gradsky (A) y *S. pimpinellifolium* (B) no tratadas (izquierda) y tratadas 1 día o 7 días con 130 mM de NaCl.

Tabla R2. Pesos fresco y seco de raíz, tallo y hojas de plantas de *S. lycopersicum* cv. volvogradski y *S. Pimpinellifolium* no tratadas y tratadas con NaCl durante 1 y 7 días. Los resultados se expresan en gramos por planta y son media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.. Valores seguidos de diferentes letras difieren significativamente. (Test de Duncan $P=0,05$) PF, peso fresco; PS, peso seco

		Sin tratar	NaCl 1 día	NaCl 7 días	
<i>S. lycopersicum</i> cv. volvogradsky	Raíz	PF	12,2 \pm 0,6a	11.4 \pm 0,6a	7,6 \pm 0,4b
		PS	0,69 \pm 0,03l	0,451 \pm 0,022n	0,361 \pm 0,018p
	Tallo	PF	6,6 \pm 0,3cde	5,5 \pm 0,3g	3,54 \pm 0,18i
		PS	0,68 \pm 0,03l	0,54 \pm 0,03m	0,143 \pm 0,007s
	Hoja	PF	6,6 \pm 0,3cde	6,5 \pm 0,3de	5,2 \pm 0,3g
		PS	1,11 \pm 0,06j	0,90 \pm 0,04k	0,47 \pm 0,02n
<i>S. Pimpinellifolium</i>	Raíz	PF	7,1 \pm 0,3bcd	7,3 \pm 0,4bc	6,3 \pm 0,3ef
		PS	0,262 \pm 0,013q	0,17 \pm 0,008r	0,162 \pm 0,008r
	Tallo	PF	4.53 \pm 0,23h	4,36 \pm 0,22h	4,47 \pm 0,22h
		PS	0,40 \pm 0,02o	0,352 \pm 0,017p	0,40 \pm 0,02op
	Hoja	PF	5,3 \pm 0,3g	5,7 \pm 0,3fg	5,6 \pm 0,3g
		PS	0,57 \pm 0,03m	0,70 \pm 0,03l	0,64 \pm 0,03l

A medida que se prolonga el tiempo de exposición de las plantas al NaCl se observa que la especie tolerante acumula más Na⁺ que la especie sensible (Fig. R5A). Además, la especie sensible mantiene niveles de K⁺ más altos en tallo, pero más bajos en raíz que la especie tolerante, sobre todo en condiciones salinas (Fig. R5B).

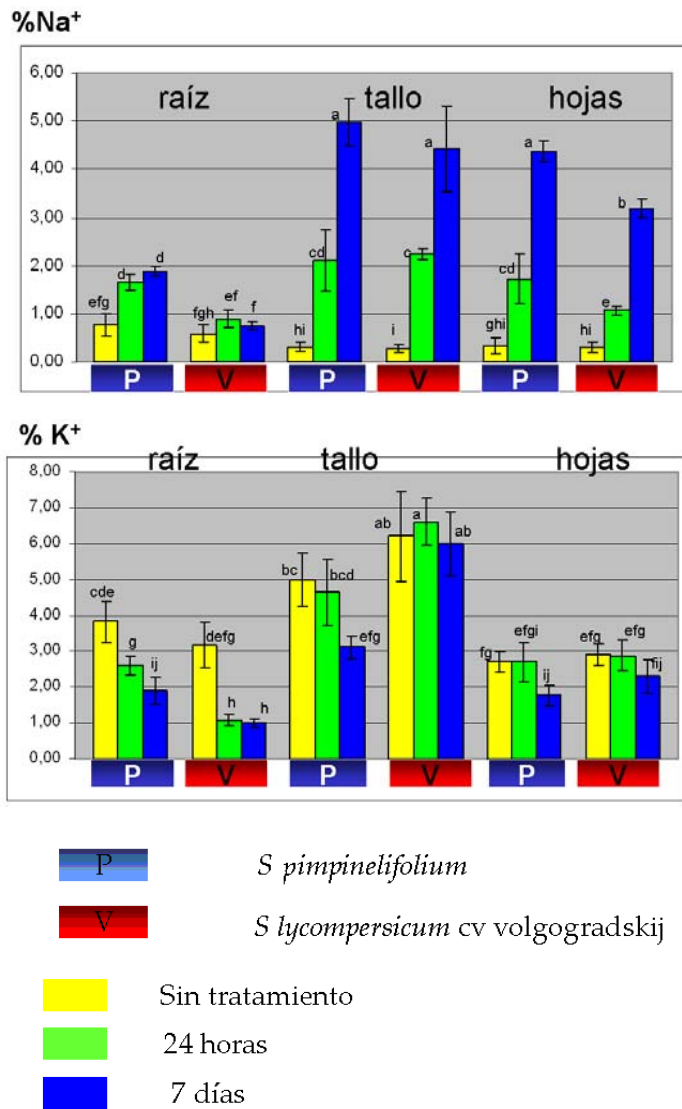


Fig. R5. Contenido de Na⁺ y K⁺ en raíz, tallo y hojas de plantas *S. pimpinelifolium* y *S. lycopersicum* cv. volgogradskij cultivadas sin NaCl (C), con 130 mM NaCl durante 1 día (1d), o con concentraciones crecientes de NaCl (50, 100 y 130 mM NaCl) durante 7 días (7d). Los resultados se expresan como porcentaje en relación al peso seco y son media \pm desviación estándar de 3 experimentos. Valores seguidos de diferentes letras difieren significativamente. (Test de Duncan P=0,05)

Se llevaron a cabo estudios de expresión de los genes LeNHX1, 2, 3 y 4 en raíz, tallo y hojas de las plantas de tomate, mediante análisis por PCR a tiempo real, utilizando como gen referencia el ribosómico 18s (Figs. R6, R7, R8 y R9). En todos los casos, los resultados se expresaron como incrementos o disminuciones respecto a la expresión de LeNHX1 en raíces de *S. pimpinelifolium* en ausencia de estrés, a la que se asignó el valor 1. Se llevaron a cabo tres extracciones de RNA para cada tratamiento y dos reacciones de RT-PCR por cada muestra de RNA. Los resultados obtenidos en estos ensayos presentaron una desviación típica, respecto a la media, menor del 12%.

Cuando las plantas se someten a estrés salino de corta duración (24 horas), se induce la expresión de LeNHX1 en todos los órganos de la especie tolerante, mientras que en la especie sensible solamente se induce en hojas (Fig. R6). En el caso de un estrés de larga duración, la expresión de LeNHX1 aumenta tanto en la especie sensible como en la especie tolerante en raíces y tallos, pero no en hojas. Tanto en estreses cortos como largos el mayor grado de inducción se aprecia en raíces y en hojas de la especie tolerante lo que indica que LeNHX1 podría estar implicado en la mayor tolerancia a sal y acumulación de Na⁺.

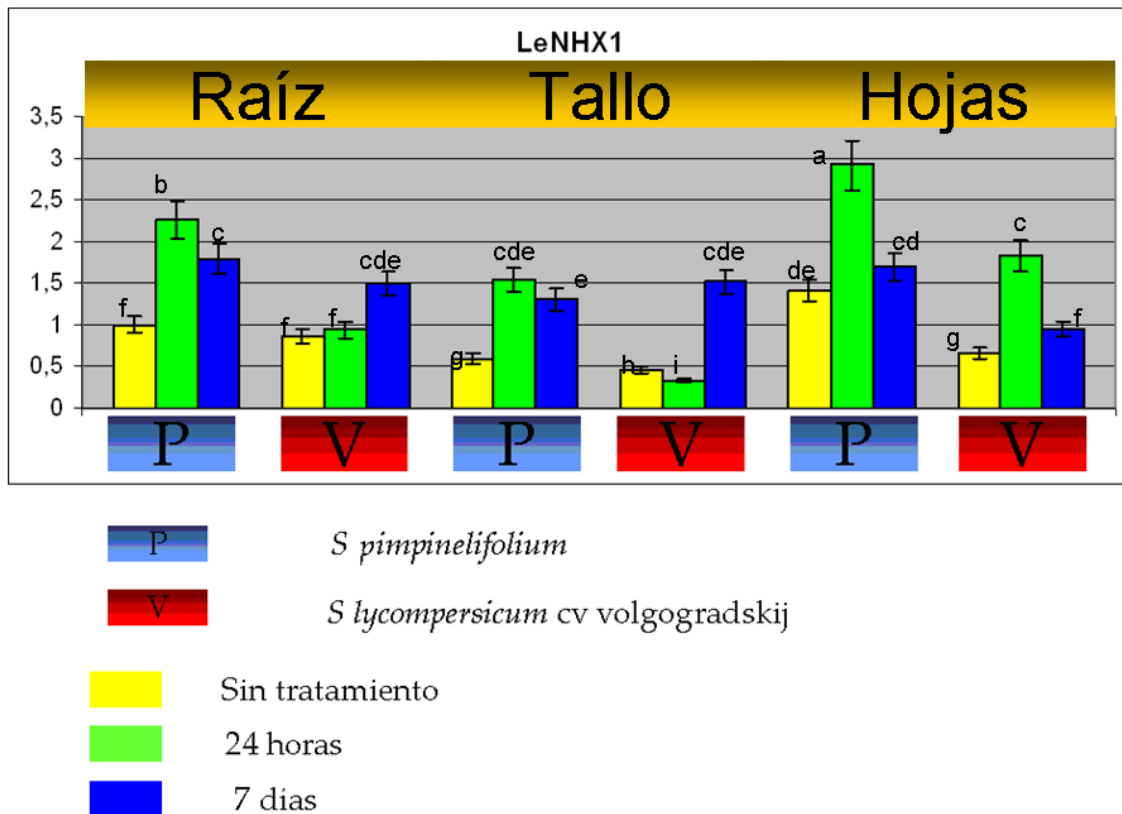


Fig. R6. Expresión relativa de LeNHX1 en raíz, tallo y hojas de *S. pimpinelifolium* y *S. lycopersicum* cv volgogradskij, cultivadas sin NaCl, con 130 mM NaCl durante 24 horas y durante 7 días a concentraciones salinas crecientes (50, 100 y 130 mM NaCl). Los resultados son media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. Valores seguidos de diferentes letras difieren significativamente. (Test de Duncan $P=0,05$)

La expresión de LeNHX2 se induce por el estrés salino de 24 h o 7 días sobre todo en raíz y, en mucho menor grado, en tallo y hoja de la especie tolerante, no observándose cambios significativos en la especie sensible (Fig.

R7). La expresión de este gen podría estar relacionada con el mayor contenido en Na^+ y K^+ en raíces en la especie tolerante

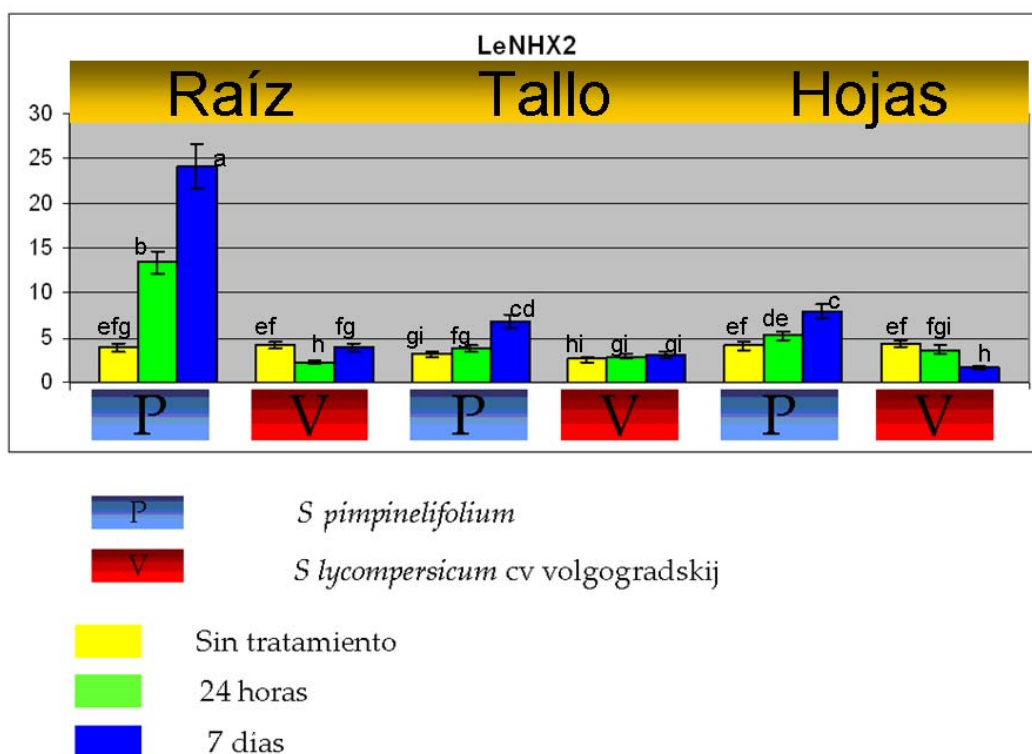


Fig. R7. Expresión relativa de LeNHX2 en raíz, tallo y hojas de *S. pimpinelifolium* y *S. lycopersicum* cv volgogradskij cultivadas sin NaCl, con 130 mM NaCl durante 24 horas o tratadas 7 días con concentraciones crecientes de NaCl (50, 100 y 130 mM NaCl). Los resultados son media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. Valores seguidos de diferentes letras difieren significativamente. (Test de Duncan $P=0,05$)

Se observó también que el estrés salino de 7 días inducía la expresión de LeNHX3 en todos los tejidos tanto de la especie tolerante como de la sensible, aunque la inducción en *S. pimpinelifolium* siempre fue mayor que en

S. lycopersicum cv volgogradskij, lo que sugiere que LeNHX3 podría estar implicado en la mayor tolerancia a la salinidad y en la acumulación de Na⁺ en la especie tolerante (Fig. R8). El grado de inducción detectado era similar en todos los tejidos.

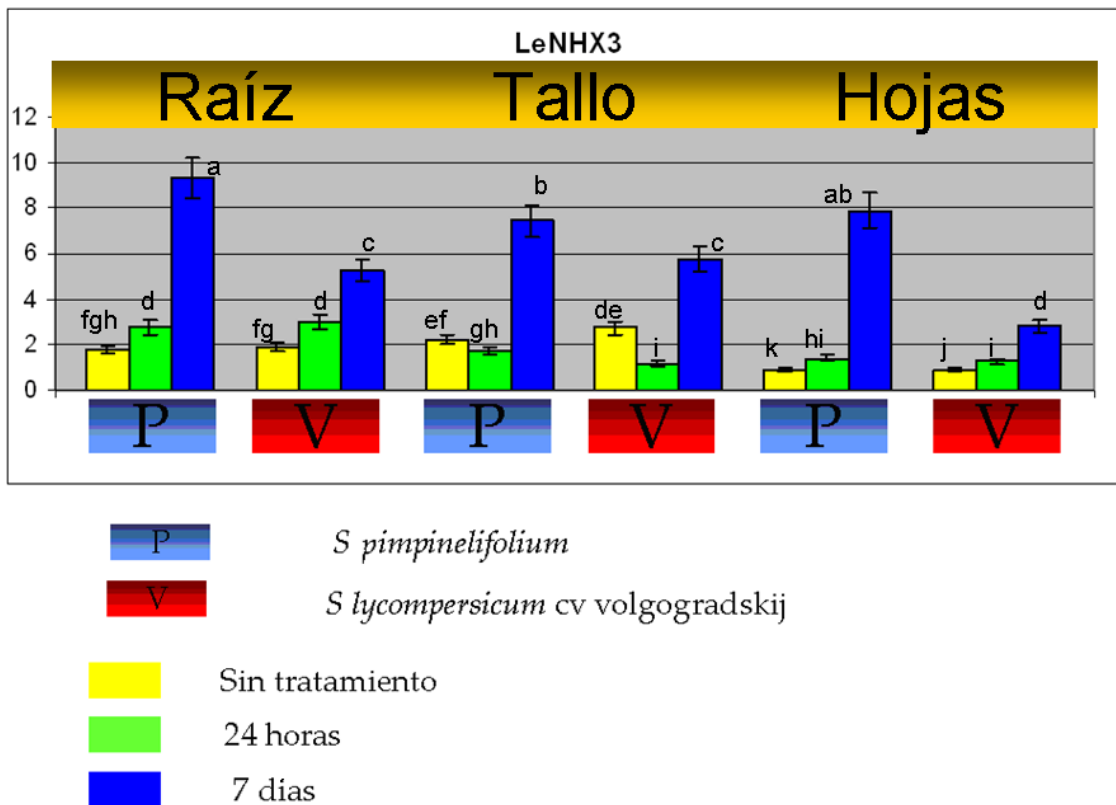


Fig R8. Expresión relativa de LeNHX3 en raíz, tallo, y hojas de *S. pimpinelifolium* y *S.lycopersicum* cv. volgogradskij cultivadas sin NaCl, con 130 mM NaCl durante 24 horas y tratadas 7 días con concentraciones crecientes de NaCl (50, 100 y 130 mM NaCl). Los resultados son media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. Valores seguidos de diferentes letras difieren significativamente. (Test de Duncan P=0,05)

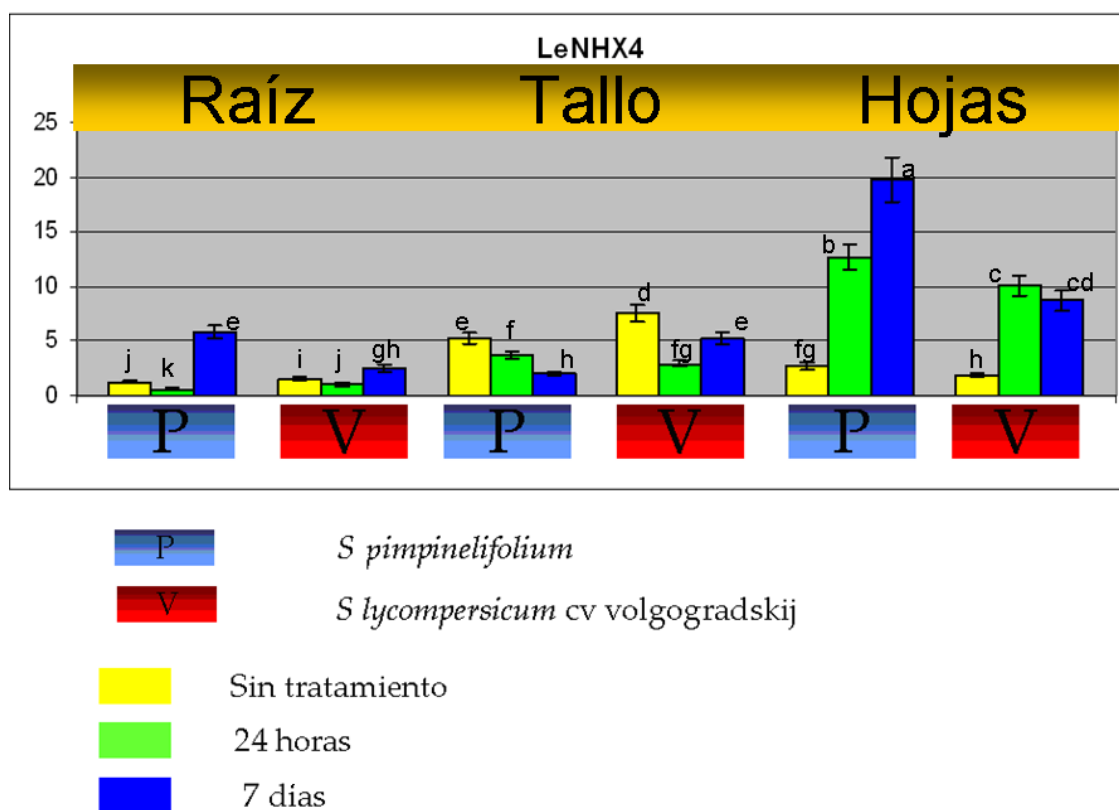


Fig. R9. Expresión relativa de LeNHX4 en raíz, tallo y hojas de *S. pimpinelifolium* y *S. lycopersicum* cv. volgogradskij cultivadas sin NaCl, con 130 mM NaCl durante 24 horas y tratadas 7 días con concentraciones crecientes de NaCl (50, 100 y 130 mM NaCl). Los resultados son media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. Valores seguidos de diferentes letras difieren significativamente. (Test de Duncan $P=0,05$)

La expresión de LeNHX4 se indujo en hojas, tanto por estrés de corta como por estrés de larga duración y fue mayor en la especie tolerante. En tallo la expresión de esta isoforma disminuyó con el estrés salino, sobre todo

en la especie tolerante. También en raíz, la expresión disminuyó tanto en la especie tolerante como en la especie sensible por estrés de corta duración. Estos resultados podrían indicar un papel en el ajuste osmótico mediante acumulación de Na⁺ o K⁺ en hoja, en respuesta a estrés de corta duración (Fig. R9).

3. Caracterización funcional de antiportadores LeNHXs en levadura

3.1. Estudios de complementación

Los genes NHX de plantas pueden complementar el fenotipo de sensibilidad a sal e higromicina causado por la disrupción de ScNHX1 en levadura (Gaxiola et al 1999; Quintero et al 2000; Yokoi et al 2002; Venema et al 2003). Se ha demostrado que el gen ScNHX1 es idéntico a VPS44 (*Vacuolar Protein Sorting protein 44*). La sensibilidad a higromicina, además de ser el fenotipo más evidente de la disrupción de ScNHX1, es un fenotipo frecuente entre los mutantes del tipo VPS, con defectos en el tráfico y procesamiento de proteínas entre compartimentos endosomales y vacuola y podría estar relacionado con una deficiencia en la biogénesis de la vacuola, sitio de posible degradación del compuesto, o con una deficiencia en el tráfico vesicular (Mukerjee et al 2006).

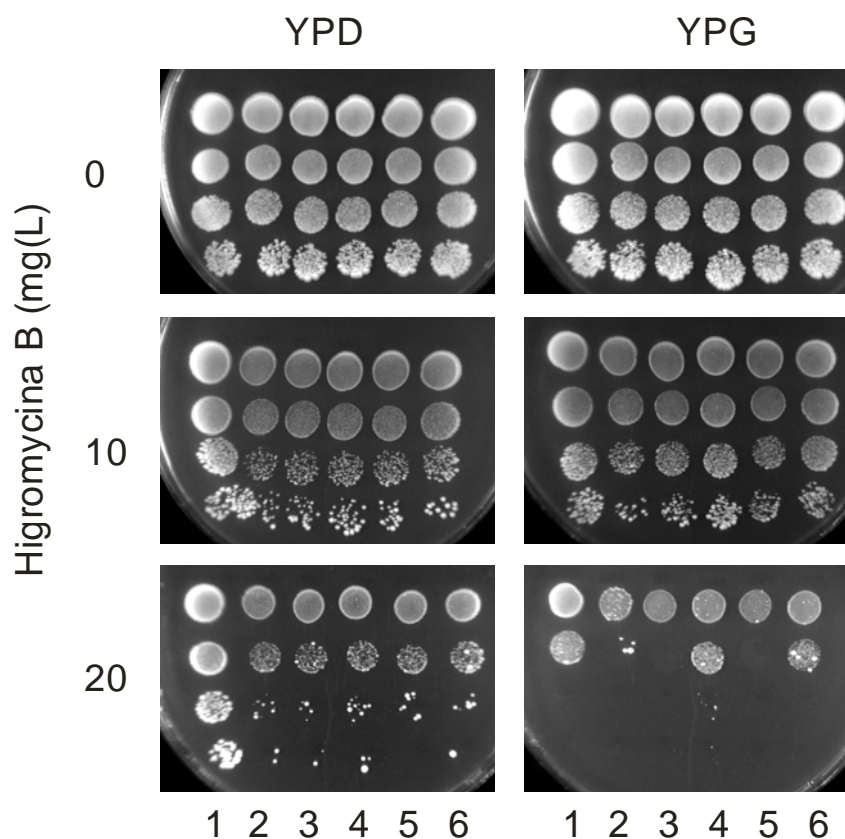


Fig. R10. Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas W303 y WX1 ($\Delta nhx1$), no transformadas y transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores LeNHXs con tag H6-V5, clonados en el vector pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de higromicina B en medios suplementados con galactosa o glucosa. 1: Cepa control W303; 2: WX1; 3: WX1 + LeNHX1; 4: WX1 + LeNHX2; 5: WX1 + LeNHX3; 6: WX1 + LeNHX4.

Para comprobar la complementación de la sensibilidad a higromicina por los genes LeNHXs hemos utilizado la cepa de levadura WX1 (Tabla M4, Material y Métodos), con una disrupción del antiportador ScNHX1, y la hemos transformado con los cDNAs de los antiportadores LeNHXs sin codón *stop* clonados en el vector pYES-DEST52. La expresión de los cDNAs

sin codón *stop* en este vector da lugar a proteínas etiquetadas con una cola de histidinas y el epítipo V5. Como control de estos ensayos, se utilizó la cepa W303, que no presenta disrupciones. Tras un precultivo en medio SD selectivo, se realizaron los ensayos *droptests* en medios YPD o YPG suplementados con 0, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ higromicina B. Se observó que el crecimiento de las células de la cepa WX1 era inhibido fuertemente en presencia de higromicina B, mientras que las levaduras de la cepa W303 crecían a concentraciones de hasta 20 mg/ml de higromicina, tanto en medio YPD como YPG (Fig. R10). Ninguna de las cepas transformadas con los antiportadores de tomate creció en medio YPD suplementado con higromicina, ya que la expresión de los antiportadores está bajo control del promotor GAL1 y, en consecuencia, sólo se indujo en medio YPG conteniendo galactosa. En este medio YPG, solamente las cepas transformadas con los cDNAs de LeNHX2 y LeNHX4 crecían en presencia de higromicina B.

El efecto de la disrupción de ScNHX1 sobre la tolerancia al NaCl es más difícil de demostrar. La tolerancia a la salinidad de la levadura, capaz de crecer a concentraciones de NaCl hasta de 1M, se debe fundamentalmente a la actividad de la ATPasa tipo P ENA1, responsable de la extrusión activa de Na^+ y, en menor medida, a la actividad del antiportador de la membrana plasmática NHA1 (Quintero y col 2000).

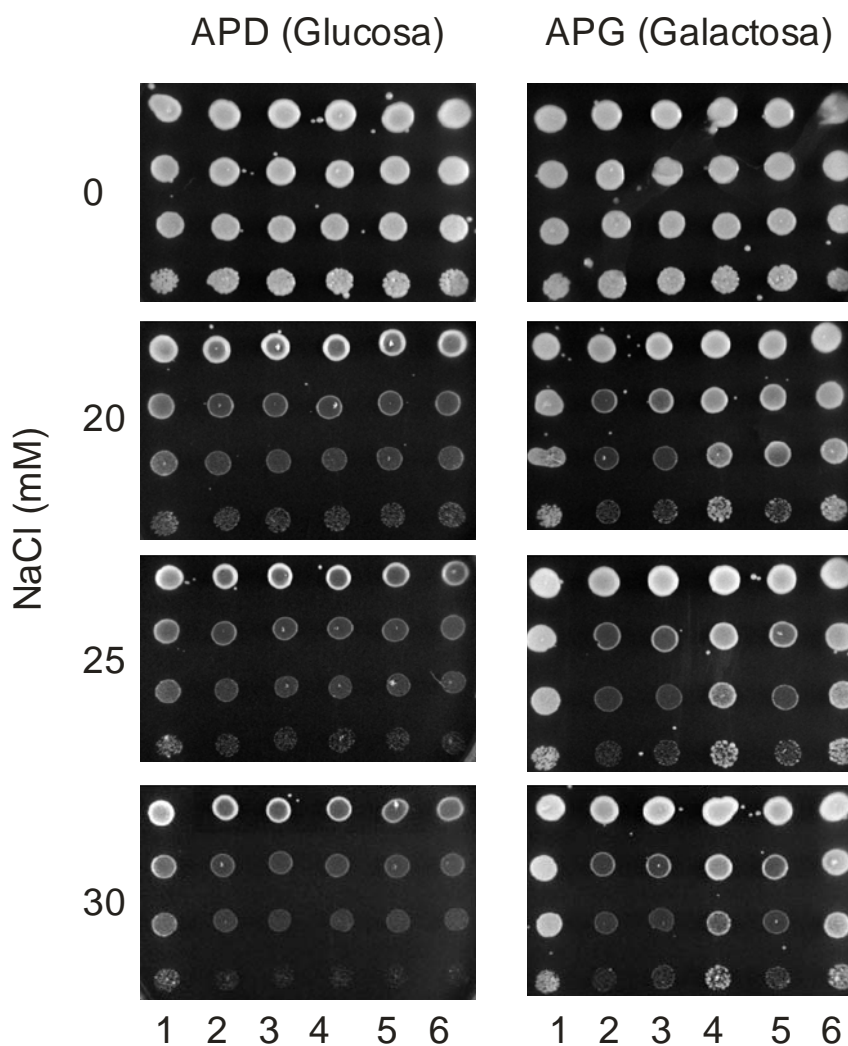


Fig. R11. Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas ANT3 y AXT3 (Δ ena1-4, Δ nha1, Δ nhx1) no transformadas y transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores LeNHXs con tag H6-V5, clonados en el vector pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de NaCl en medio AP suplementado con galactosa o glucosa. 1: Cepa control ANT3; 2: AXT3; 3: AXT3 + LeNHX1; 4: AXT3 + LeNHX2; 5: AXT3 + LeNHX3; 6: AXT3 + LeNHX4

Las plantas, a diferencia de levaduras, no se desarrollan en un medio acuoso externo de gran volumen, por lo que adquiere gran importancia la compartimentación del exceso de Na^+ en vacuolas. No obstante, la disrupción de los sistemas de transporte ENA1 y NHA1, dan como resultado una levadura altamente sensible a sal que permite estudiar el efecto de ScNHX1 o de los antiportadores de plantas sobre la resistencia a la sal. Por ello, hemos utilizado la cepa de levadura AXT3 con disrupciones en los sistemas de transporte ENA1-4, NHA1 y NHX1 para realizar los estudios de complementación de la sensibilidad a NaCl en células transformadas con los antiportadores de tomate. Como control hemos utilizado la cepa ANT3, con dirupciones en ENA1-4 y NHA1. Tras un precultivo en medio SD selectivo, se realizaron los ensayos *droptests* en medios APD o APG suplementados con 0, 20, 25 y 30 mM NaCl. Se observó que el crecimiento de la cepa AXT3 era fuertemente inhibido en presencia NaCl. La expresión de los antiportadores LeNHX2 y LeNHX4 confiere tolerancia a NaCl a esta cepa, ya que permitió el crecimiento en medios suplementados con NaCl en presencia de galactosa, necesaria para la inducción de la expresión de los antiportadores (Fig. R11). También se observó que la expresión del antiportador LeNHX3 provocaba un pequeño incremento en la tolerancia a sal.

Se ha demostrado que la disrupción de ScNHX1 confiere sensibilidad a altas concentraciones de KCl a la cepa AXT3, lo que estaría relacionado con el papel de los transportadores NHX en la osmotolerancia y la acumulación de KCl en la vacuola (Venema et al 2003). Para comprobar el efecto de los antiportadores de tomate sobre la tolerancia a altas concentraciones de KCl

hemos realizado estudios de complementación funcional, utilizando las cepas ANT3 y AXT3, ésta última transformada con los antiportadores de tomate. Se observó de nuevo que solamente los antiportadores LeNHX2 y LeNHX4 confieren tolerancia a una concentración elevada de KCl (Fig. R12).

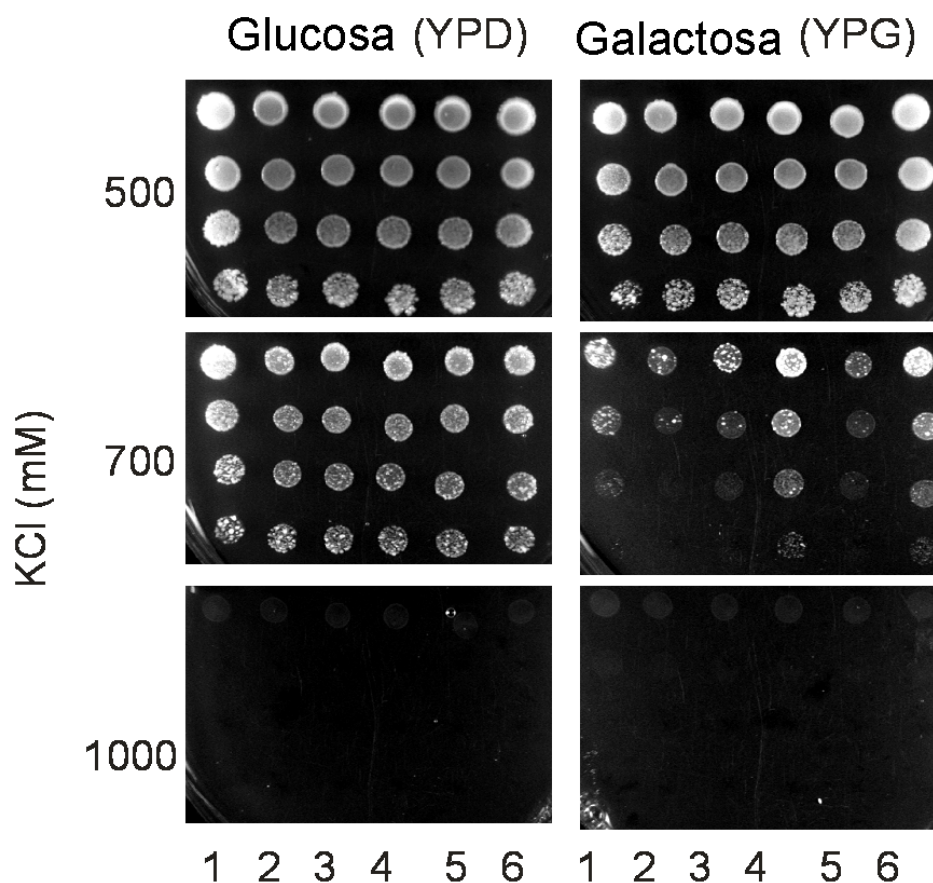


Fig. R12. Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas ANT3 y AXT3 (Δ ena1-4, Δ nha1, Δ nhx1) no transformadas y transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores LeNHXs con tag H6-V5 clonados en el vector pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de KCl en medio YP suplementado con glucosa (YPD) o galactosa (YPG). 1: Cepa control ANT3; 2: AXT3; 3: AXT3 + LeNHX1; 4: AXT3 + LeNHX2; 5: AXT3 + LeNHX3; 6: AXT3 + LeNHX4.

Además de ScNHX1, existe otro antiportador intracelular de la familia CPA en levadura, ScKHA1, que ha sido localizado en la membrana del Golgi, y que estaría implicado en el intercambio K^+/H^+ y la tolerancia a un déficit de K^+ en condiciones de pH alcalino (Maresova y Sychrova 2005). Este fenotipo es solamente evidente en una cepa de levadura con disrupciones en los transportadores ENA1-4, NHA1 y NHX1 (Maresova y Sychrova 2005). Se ha demostrado que la expresión de algunas proteínas de la familia CHX de plantas complementa el fenotipo causado por la disrupción de ScKHA1 (Maresova y Sychrova 2006, Padmanaban 2007), pero no se ha estudiado el efecto de la expresión de los antiportadores de la familia NHX.

Para determinar si los genes LeNHX complementan la sensibilidad a un déficit de K^+ a pH alcalino causado por la disrupción de KHA1, hemos realizado estudios en la cepa AXT4 con disrupciones en los sistemas de transporte ENA1-4, NHA1, NHX1 y KHA1 (Tabla M4, Material y Métodos), transformadas con los antiportadores LeNHX1, 2, 3 y 4, y como control células no transformadas de la cepa AXT3 (Fig R13). Se observó que la expresión de los antiportadores de tomate no complementaba la disrupción de KHA1, ya que las cepas transformadas no crecían mejor que la cepa AXT4. Solamente la presencia de KHA1 en la cepa AXT3 permite crecimiento en ausencia de K^+ .

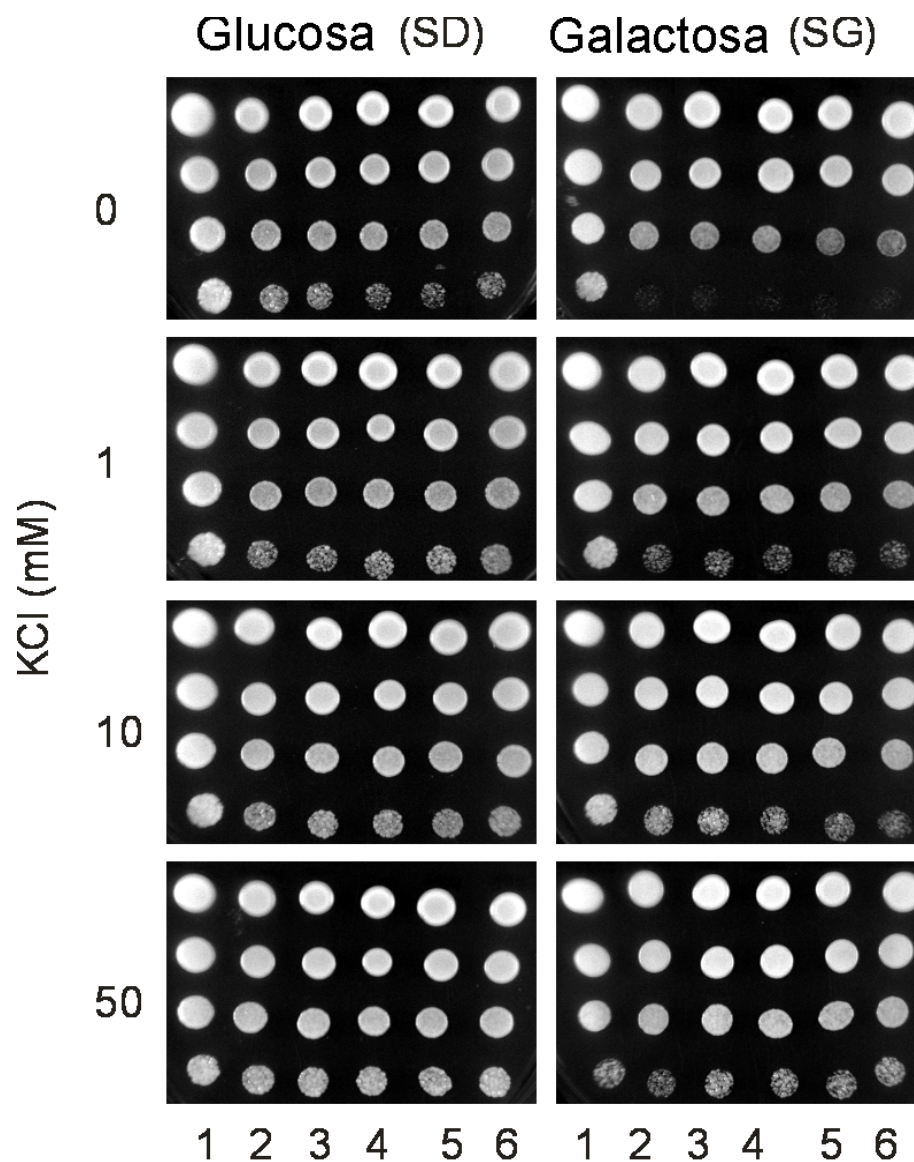


Fig. R13. Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas AXT3 y AXT4 (Δ ena1-4, Δ nha1, Δ nhx1, Δ kha1) no transformadas y transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores LeNHX etiquetados con H6-V5, clonados en el vector pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de KCl en medio SD o SG ajustado a pH 7,5 con arginina. 1: Cepa control AXT3; 2: AXT4; 3: AXT4 + LeNHX1; 4: AXT4 + LeNHX2; 5: AXT4 + LeNHX3; 6: AXT4 + LeNHX4

En los estudios de complementación se han utilizado cDNAs clonados sin codón de *stop* en el vector pYES-DEST52, dando lugar a la expresión de transportadores etiquetados con una secuencia codificante de una cola de 44 aminoácidos, incluyendo la cola de 6 histidinas, el epítipo V5, así como la secuencia del vector necesario para la recombinación. Hemos estudiado el efecto de esta cola sobre la capacidad de las proteínas LeNHX2 y LeNHX4 para complementar la sensibilidad a Higromicina y sal en las cepas WX1 y AXT3. Para ello, LeNHX2 y LeNHX4 se clonaron con codón de *stop* en el vector pYES-DEST52, dando lugar a la proteína nativa sin cola adicional. Por otra parte, se generaron por PCR construcciones de LeNHX2 y LeNHX4 en pYES-DEST52 que daban lugar a proteínas de fusión con una cola RGS10 de sólo 13 aminoácidos fusionados directamente al último aminoácido de la proteína, lo que permitió estudiar el efecto de una cola C-terminal adicional más corta sobre la complementación de la sensibilidad a higromicina o sal por los antiportadores LeNHX 2 y 4 (Figs. R14 y R15).

La larga cola de 44 aminoácidos del tag V5-H6 parece afectar negativamente a la complementación por LeNHX2 de la sensibilidad a higromicina en la cepa WX1, mientras que el efecto sobre la complementación de la sensibilidad a NaCl en la cepa AXT3 es menos importante. La cola de 13 aminoácidos del tag RGS10 afecta mucho menos a la complementación por LeNHX2 (Fig R14). No se observaron diferencias significativas en la complementación de la sensibilidad a higromicina o NaCl entre las cepas de levadura que expresan la proteína LeNHX4 sin tag

adicional, con el tag de 44 aminoácidos, o con el tag de 13 amino ácidos, respectivamente (Fig.R15).

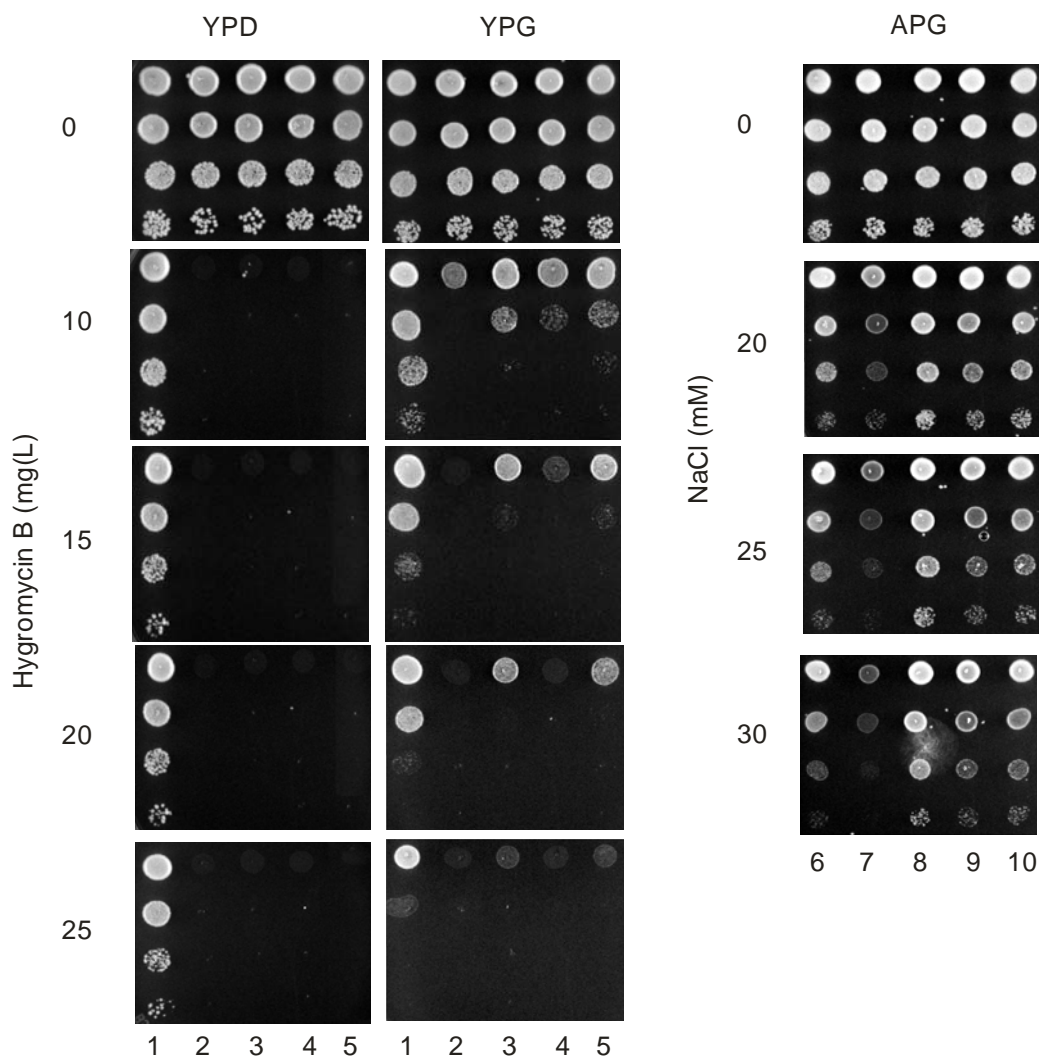


Fig. R14. Complementación por LeNHX2 de la sensibilidad a Higromicina y NaCl. Crecimiento en presencia de NaCl o Higromicina B de células de *S. cerevisiae*, cepas WX1 y AXT3 transformadas con las construcciones para la expresión del antiportador LeNHX2 con distintos *tags* c-terminales clonado en el vector pYES-DEST52. 1: Cepa control W303; 2: WX1; 3: WX1 + LeNHX2; 4: WX1+ LeNHX2-V5-H6; 5: WX1+LeNHX2RGSH10; 6: Cepa control ANT3; 7: Cepa AXT3; 8: AXT3+LeNHX2; 9: AXT3+LeNHX2V5-H6; 10: AXT3+LeNHX2RGSH10

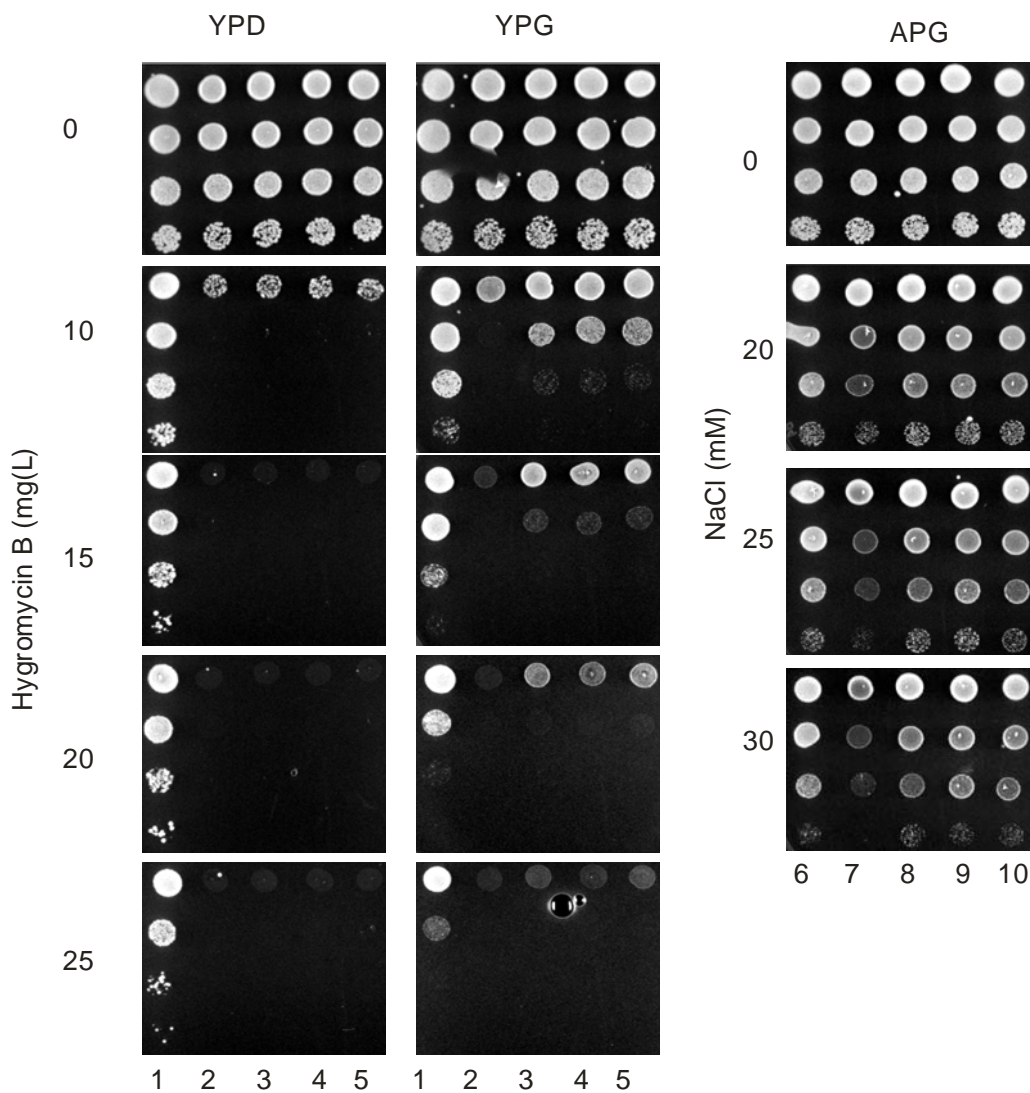


Fig. R15 Complementación por LeNHX4 de la sensibilidad a Higromicina y NaCl. Crecimiento en presencia de NaCl o Higromicina B de células de *S. cerevisiae*, cepas WX1 y AXT3 transformadas con las construcciones para la expresión del antiportador LeNHX4 con distintos *tags* C-terminales clonado en el vector pYES-DEST52 1: Cepa control W303; 2: WX1; 3: WX1 + LeNHX4; 4: WX1+ LeNHX4-V5-H6; 5: WX1+LeNHX4RGSH10; 6: Cepa control ANT3; 7: Cepa AXT3; 8: AXT3+LeNHX4; 9: AXT3+LeNHX4V5-H6; 10: AXT3+LeNHX4RGSH10

Ya que la cola de 13 amino ácidos del *tag* RGS10 no parece afectar a la funcionalidad de las proteínas hemos utilizado este *tag* para los experimentos de purificación y reconstitución de los antiportadores en los ensayos funcionales *in vitro*.

3.2. Caracterización funcional *in vitro*.

3.2.1. Inmunodetección y purificación de proteínas NHX de tomate expresadas en levadura

Para detectar las isoformas LeNHX1,2, 3 y 4 en membranas microsomales de levaduras transformadas con los antiportadores de tomate, se utilizó un anticuerpo frente al epítipo RGS4 presente en el extremo C-terminal de dichas proteínas. Las proteínas LeNHX2, 3 y 4, pero no la proteína LeNHX1, pudieron ser purificadas por cromatografía de afinidad en columna de níquel (apartado 2.5.5, Material y Métodos). Las proteínas eluidas de la columna se separaron por electroforesis, y se tinieron con Sypro® Ruby-Protein (Bio-Rad) o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para llevar a a cabo la inmunodetección utilizando un anticuerpo frente al epítipo RGS4. La existencia de una banda proteica mayoritaria reconocida por el anticuerpo puso de manifiesto un importante grado de purificación (Fig. R16). A efectos comparativos, se incluyó en los geles de electroforesis la proteína AtNHX1 purificada de la misma forma.

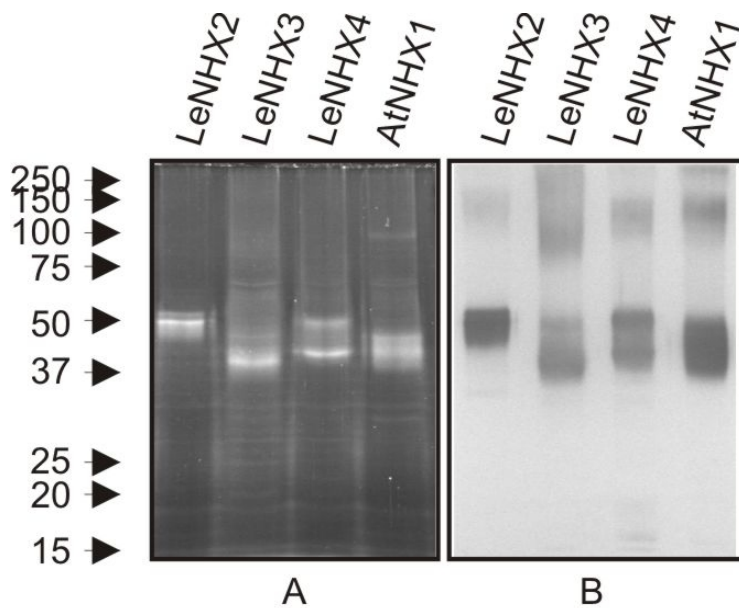


Fig. R16. Tinción (A) e inmunodetección -(B) de las proteínas LeNHX2, 3 y 4 y AtNHX1 purificadas de membranas microsomales de levadura tras separación por SDS-PAGE. Se cargó 1 μ g de proteína total en cada caso. A la izquierda de la figura se indica el peso molecular (kD) de los estándares de peso molecular incluidos en la separación electroforética.

LeNHX3 y LeNHX4 muestran un tamaño similar a la proteína AtNHX1, y son ligeramente más pequeñas que LeNHX2 (Fig. R16). Puesto que tanto LeNHX1, 2, 3, y 4 como AtNHX1 tienen un número de aminoácidos similar, es posible que las diferencias en peso molecular entre las distintas proteínas sean debidas a modificaciones post-traduccionales.

4. Determinación de la actividad de intercambio Cation/H⁺ de las proteínas NHX de tomate purificadas de levadura.

Para medir la actividad de intercambio iónico de los transportadores LeNHX2, 3 y 4 y AtNHX1, las proteínas purificadas fueron reconstituidas en liposomas. Los proteoliposomas se prepararon en presencia del indicador de pH fluorescente piranina. En un segundo paso se eliminó la piranina no encapsulada en el interior de los proteoliposomas por filtración en gel utilizando Sephadex G-50. De este modo, las medidas de fluorescencia de la sonda reflejan el pH en el interior de los proteoliposomas, y esta variación de pH en función del tiempo proporciona una medida de la actividad intercambiadora del transportador reconstituido en el liposoma. El protocolo seguido se describe el apartado 2.5.10 de Material y Métodos.

En la Fig. R17 se muestra un registro típico de la razón de la fluorescencia a 404 y 463 nm de excitación y 510 nm de emisión, en función del tiempo. Este registro se utilizó para evaluar la actividad antiporte de LeNHX2 y LeNHX4, mostrando el efecto de la conversión de la razón de fluorescencia a pH. La reacción de antiporte se inicia con la adición de KCl y se finaliza con la adición de (NH₄)₂SO₄, que suprime el gradiente de protones.

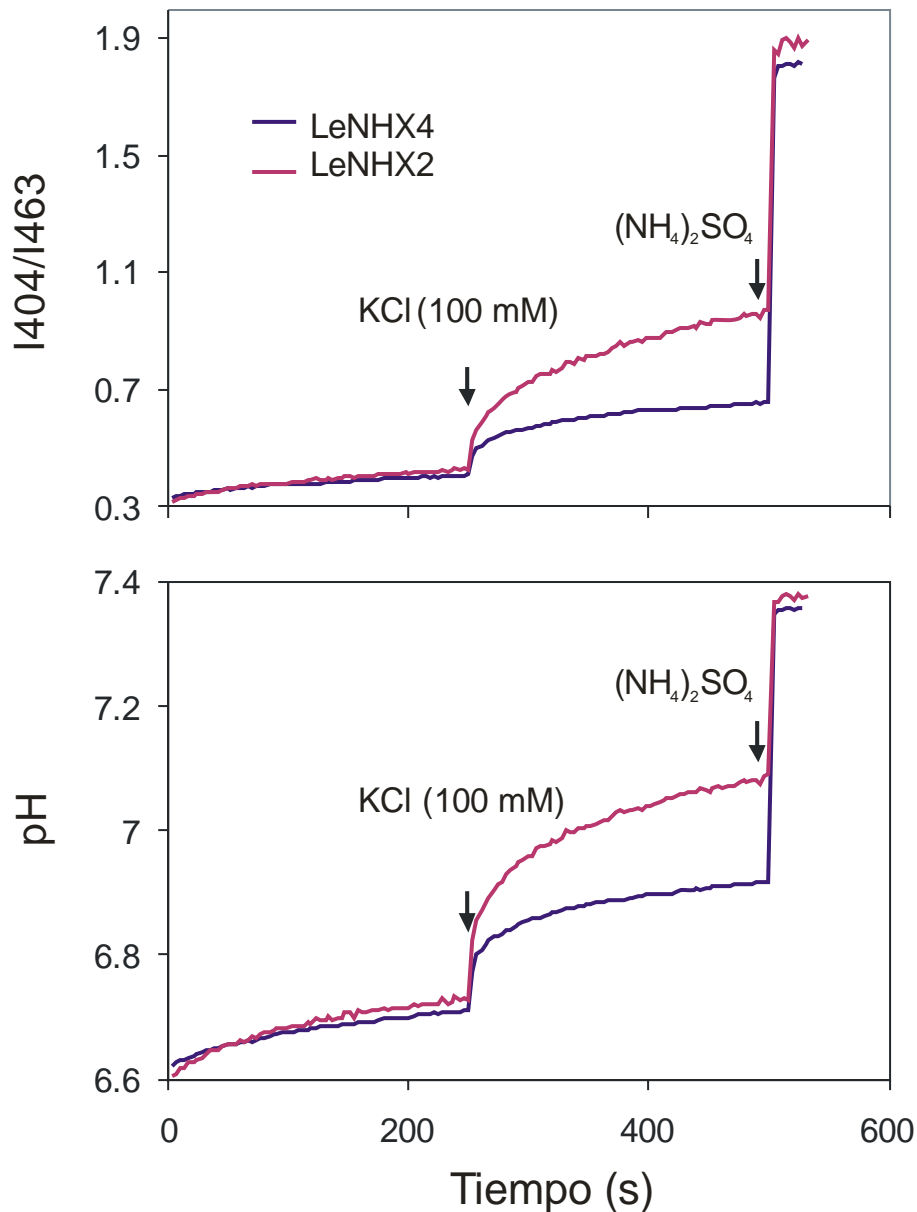


Fig. R17. Actividad antiporte de LeNHX2 y LeNHX4. Registro de la razón de la fluorescencia a 404 y 463 nm de excitación y 510 nm de emisión (panel superior) y conversión de la razón de fluorescencia a pH (panel inferior) por LeNHX2 y LeNHX4 reconstituidos en proteoliposomas. La adición de KCl y (NH₄)₂SO₄, para iniciar y finalizar la reacción de transporte se señala con flechas.

La actividad intercambiadora Cation/Protón de los antiportadores se ensayó en presencia de varias concentraciones de NaCl y KCl (Fig R18). Previamente se había descrito que las actividades intercambiadoras Na^+/H^+ y K^+/H^+ de AtNHX1 son muy similares (Venema y col 2002; Fig. R18). Por el contrario, LeNHX2 exhibe una alta actividad de intercambio K^+/H^+ y una sensiblemente más baja actividad de intercambio Na^+/H^+ (Venema y col 2003, Fig R18). LeNHX3 y LeNHX4 muestran una actividad mucho más baja que AtNHX1 o LeNHX2, siendo LeNHX4 ligeramente más activo que LeNHX3. Aunque su actividad es más baja, la afinidad y selectividad iónica de LeNHX4 es muy parecida a la de AtNHX1, lo que podría indicar funciones similares para estos dos antiportadores intracelulares del grupo I.

Se realizaron estudios de selectividad iónica para los antiportadores LeNHX2 y LeNHX4 (Fig. R19). En el caso de LeNHX2 se observó una mayor actividad antiporte en presencia de K^+ que en presencia de Na^+ . La actividad en presencia de Cs^+ o Rb^+ y, sobre todo, Li^+ era mucho más baja. En presencia del catión orgánico TMA^+ no se observó un incremento en la velocidad de alcalinización, aparte de un pequeño salto en la fluorescencia en el momento de añadir TMACl. Se desconoce porqué se produce este salto, pero podría estar relacionado con algún efecto de la fuerza iónica sobre la fluorescencia de la piranina, el pH del medio o las propiedades de los proteoliposomas. Cabe destacar que la actividad con Rb^+ es muy baja, indicando que este catión no representa un análogo de K^+ para los antiportadores tipo NHX. En cuanto a LeNHX4, la actividad es mucho más baja, siendo similar en

presencia de K^+ o Na^+ , y algo más baja con Li^+ o Cs^+ . Al igual que para LeNHX2, no se observó actividad en presencia de TMA^+ .

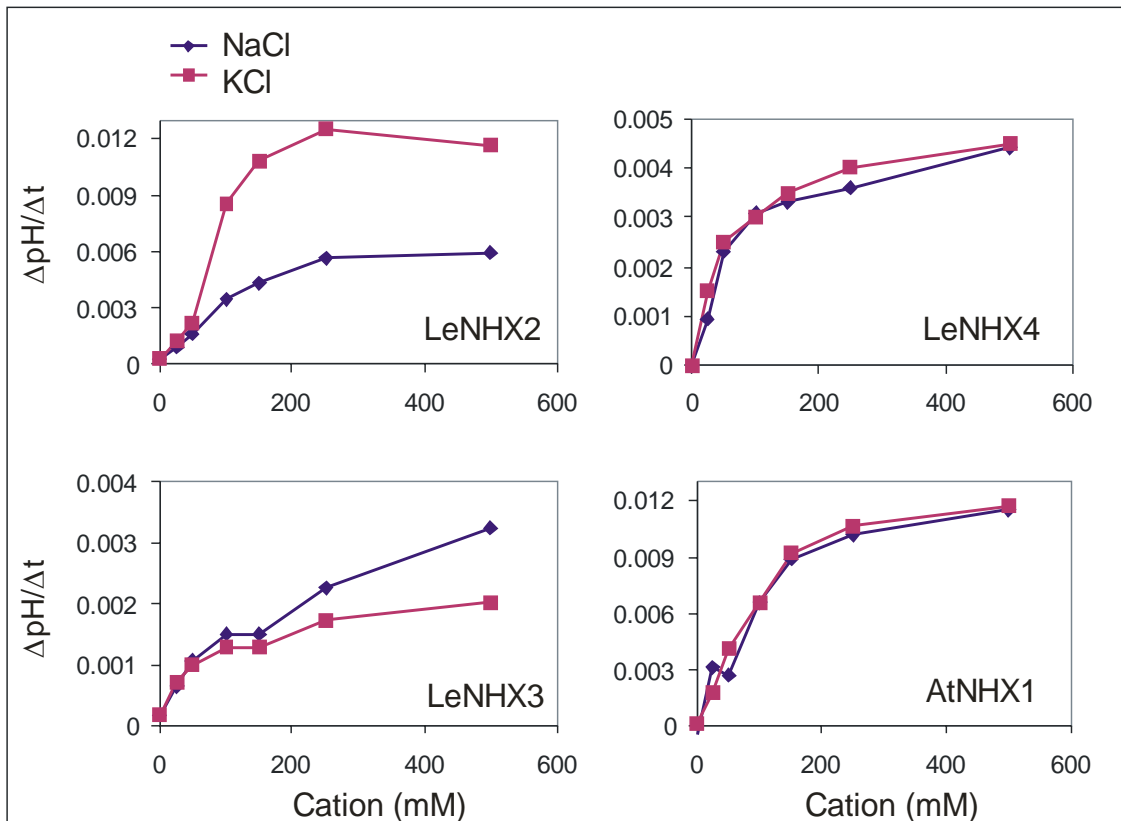


Fig R18. Actividad ($\Delta pH/\Delta t$) de los antiportadores LeNHXs reconstituidos en proteoliposomas, en función de diferentes concentraciones de NaCl o KCl. La velocidad de alcalinización ($\Delta pH/\Delta t$) se calculó como el incremento en pH en los 10 primeros segundos transcurridos tras añadir 100 μl de solución de diferentes concentraciones KCl o NaCl, sin considerar el salto en la fluorescencia inicial. En todos los casos se utilizaron 5 μg de proteína purificada para la reconstitución. Los proteoliposomas se diluyeron 20 veces en el medio de ensayo para crear un gradiente de protones (apartado 2.5.10, Material y Métodos).

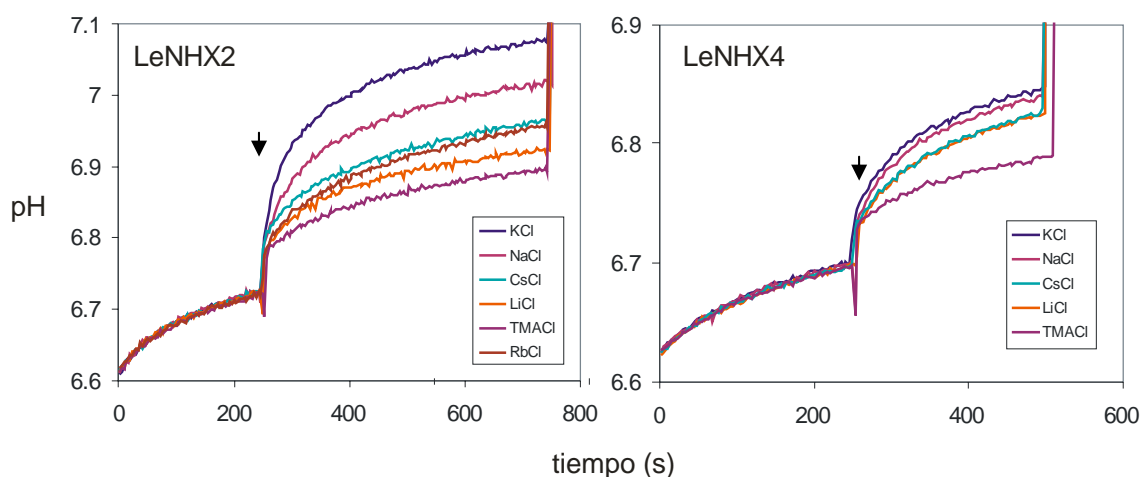


Fig. R19. Actividad antiporte de LeNHX2 y LeNHX4 en presencia de diferentes cationes. La reacción de antiporte se inició con la adición de 100 mM de sales de cloruro de diferentes cationes, y se señala con una flecha. La medida se realizó según se ha descrito en la Fig. R17.

5. Localización subcelular de LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4

La determinación de la localización subcelular de LeNHX2, 3 y 4 se ha llevado a cabo en células de epidermis de cebolla que expresan de forma transitoria proteínas de fusión de los antiportadores con GFP. La localización de LeNHX2 se llevó a cabo por microscopía confocal y la de LeNHX3 y LeNHX4 mediante estudios de epifluorescencia.

En las células que expresan la proteína de fusión del extremo C-terminal de LeNHX2 con la proteína GFP, la fluorescencia se localiza en pequeñas vesículas situadas alrededor de la gran vacuola central. Esto indica que LeNHX2 no es una proteína del tonoplasto, a diferencia de AtNHX1 o

AtNHX2 (Apse et al 1999; Quintero et al 2000; Yokoi et al 2002), sino una proteína endosomal/prevacuolar, aunque su localización exacta es aún desconocida (Fig. R20)

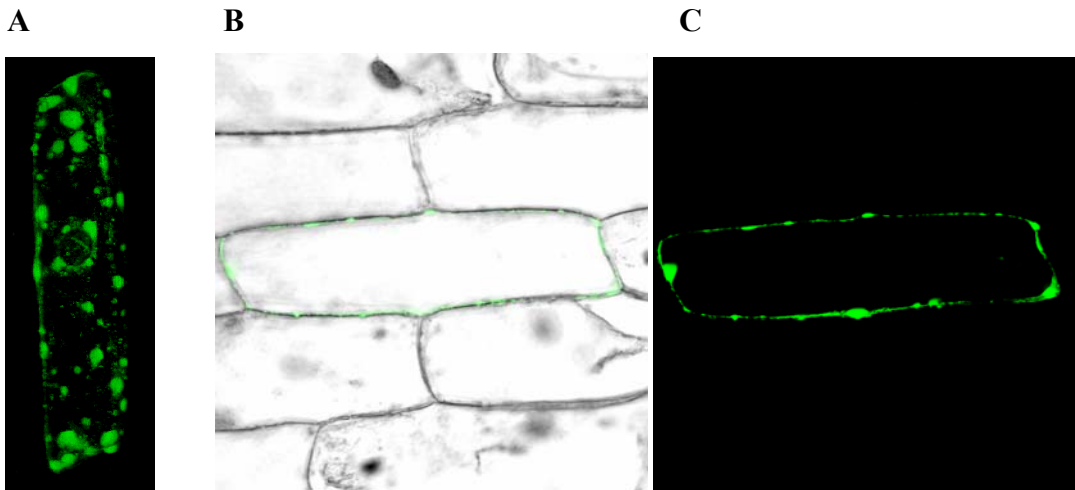


Fig. R20: Localización subcelular de LeNHX2-GFP. Panel A: Expresión transitoria en células epidérmicas de cebolla de la proteína de fusión LeNHX2-GFP visualizada por integración de varias imágenes de microscopía confocal (amplificación 20x). La fluorescencia aparece concentrada en pequeñas vesículas alrededor de la vacuola central y el núcleo. **Paneles B y C:** Imágenes de una única sección de células epidérmicas de cebolla visualizadas por microscopía confocal (amplificación 20x) con luz visible (**Panel B**) o con una línea láser de excitación a 488 nm con señales de emisión recogidas a 525 ± 50 nm (**Panel C**). Se observa la fluorescencia de GFP en la célula central.

Para determinar la localización de LeNHX3 se utilizó una construcción en la que la proteína GFP se fusiona al extremo C-terminal del transportador. Sin embargo, esta aproximación tuvo escaso éxito, posiblemente porque esta proteína es tóxica para la célula de epitelio de cebolla y ello impide su

expresión en este tipo celular. Sólo en una ocasión se obtuvieron imágenes, detectándose en ellas pequeños puntos redondeados repartidos por toda la célula (Fig. R21, panel B). Este patrón es similar al observado para el marcador G-rk (marcador de aparato de Golgi fusionado con rfp) obtenido del *Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University* www.bio.utk.edu/cellbiol/markers (Fig. R22, panel B) (Nelson et al 2007). Los experimentos de localización de LeNHX3 se repetirán en el futuro.

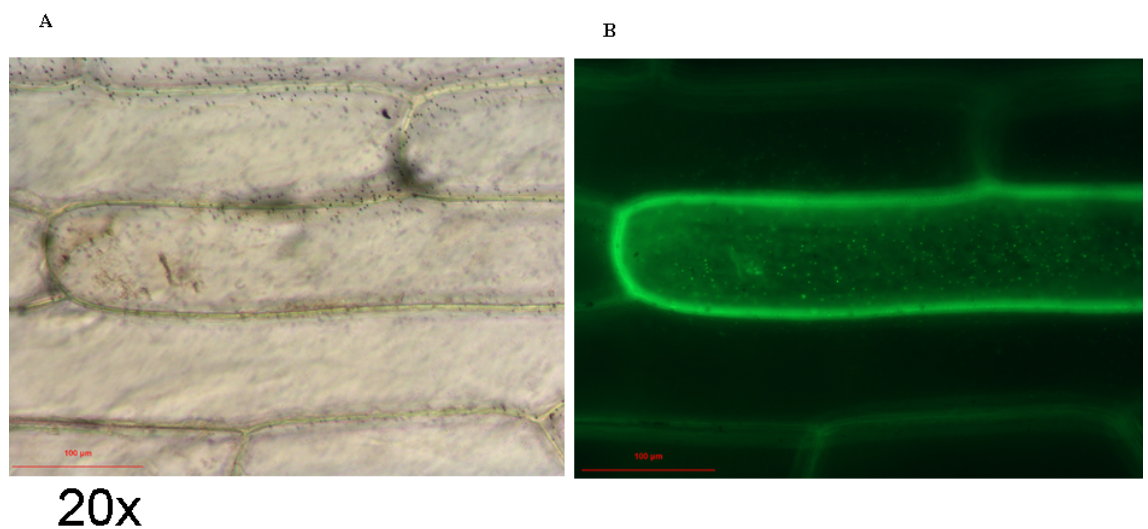


Fig. R21. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla de la proteína de fusión LeNHX3-GFP visualizada en un microscopio de epifluorescencia (20x). Imágenes obtenidas de una única sección de células epidérmicas de cebolla utilizando luz visible (Panel A) o utilizando un *set* de filtros GFP (excitación BP 450-490, Dicroico FT 510, emisión LP 515) (Panel B). Se observan pequeños puntos redondeados fluorescentes repartidos por toda la célula.

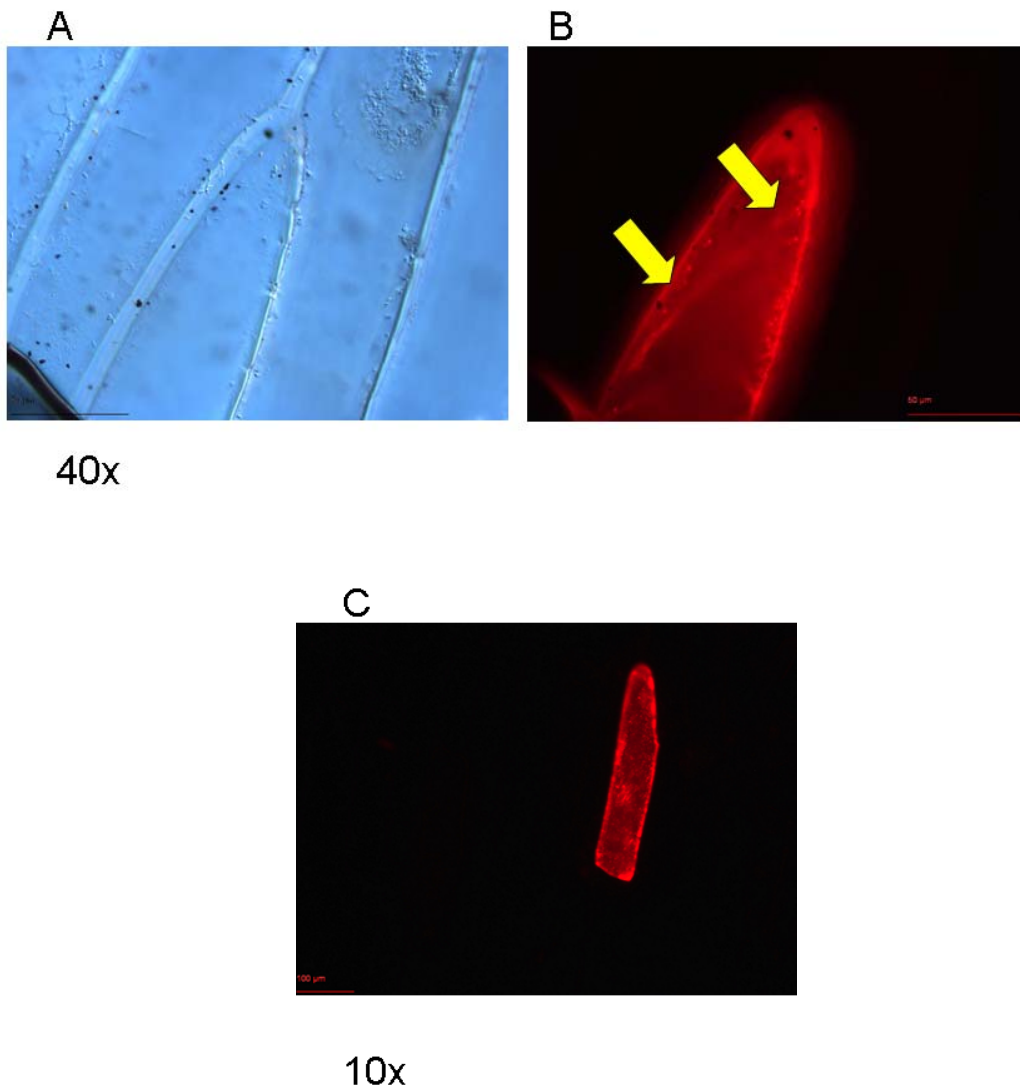
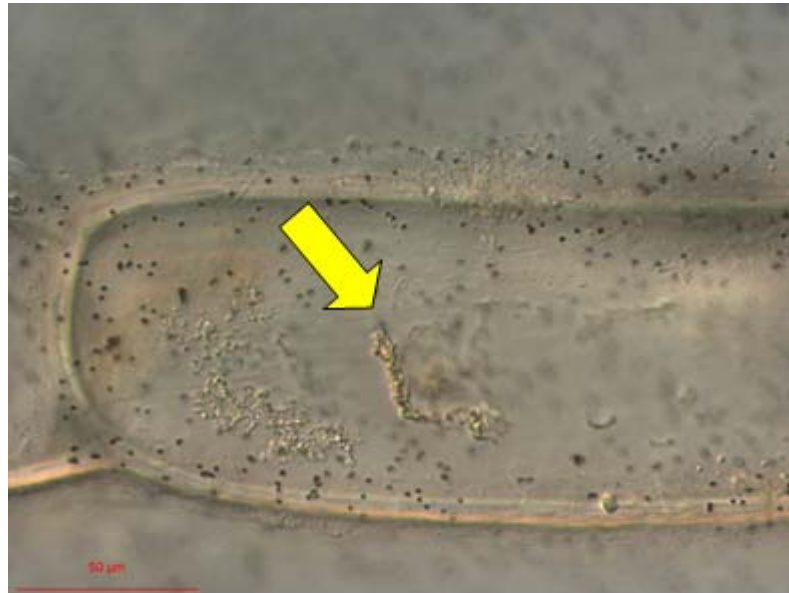


Fig R22. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla del marcador *G-rk* visualizado en un microscopio de epifluorescencia (40x paneles A y B y 10x, panel C). Imágenes obtenidas de una única sección de células epidérmicas de cebolla utilizando luz visible (Panel A) o utilizando un *set* de filtros RFP (excitación BP 546/12, Dicroico FT 580, emisión LP 590) (Paneles B y C). Se aprecian pequeños puntos redondeados fluorescentes repartidos por toda la célula, así como el contorno del tonoplasto y regiones transvacuolares (flechas).

No se puede excluir la posibilidad de que las imágenes de la Fig R22 reflejen un artefacto y de que en realidad la fluorescencia observada sea atribuible a muerte celular. En este sentido, la presencia de cromatina condensada (Fig R23) apoyaría la hipótesis de la muerte celular.

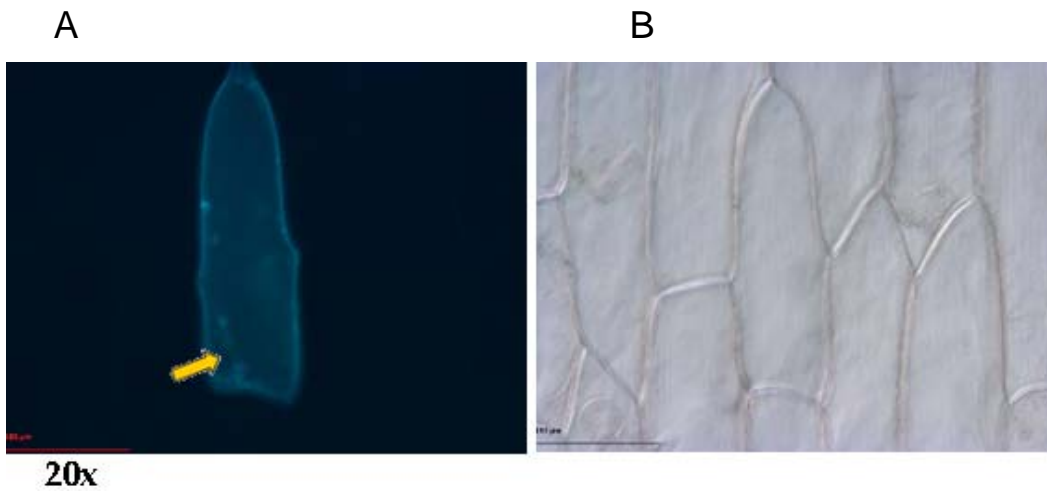


40X

Fig. R23 Imagen en un microscopio de epifluorescencia de una única sección de células epidérmicas de cebolla iluminadas con luz visible (40x). Los puntos negros son partículas de oro utilizadas para el bombardeo de las células de cebolla, la flecha indica la presencia de cromatina condensada, característica de las células que están muriendo.

Para la localización de LeNHX4 se utilizaron proteínas de fusión con GFP en el extremo C-terminal y N-terminal del antiportador. En las células

que expresan la proteína en que GFP está fusionado al extremo C-terminal de LeNHX4 se observa fluorescencia alrededor de la vacuola. En las zonas en las que la vacuola ocupa todo el volumen celular, la fluorescencia se encuentra localizada en el borde de la célula, aunque también se detectó fluorescencia en zonas donde la vacuola se separa de la periferia de la célula (señaladas con flechas en la Fig. R24). Se observa el mismo patrón de fluorescencia que se ha obtenido para AtNHX2, miembro de la familia NHX de *Arabidopsis thaliana* que se encuentra localizado en tonoplasto (Yokoi et al 2002, Fig. R25). Estos resultados permiten concluir una localización tonoplástica de LeNHX4



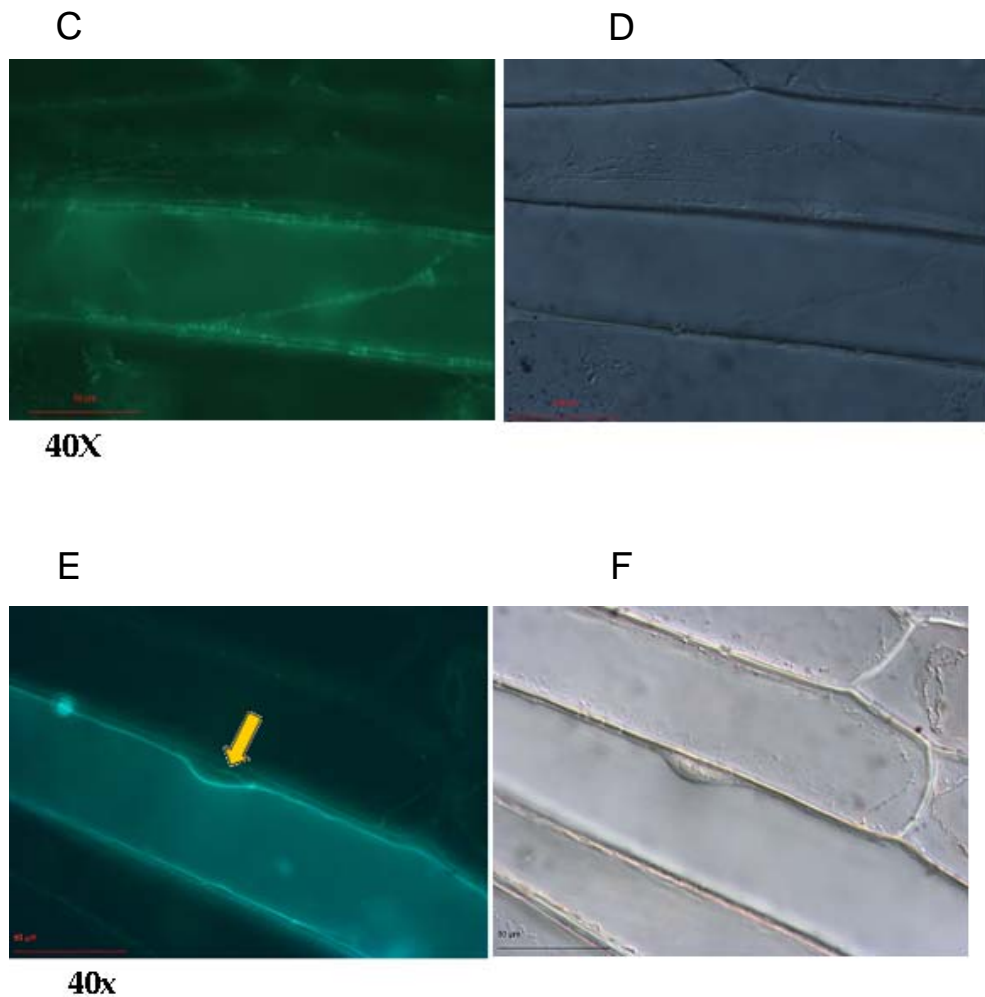


Fig R24. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla de la proteína de fusión LeNHX4-GFP visualizada en un microscopio de epifluorescencia (20x, paneles A y B y 40x paneles C, D, E y F). Imágenes obtenidas de una única sección de células epidérmicas de cebolla utilizando luz visible (paneles B, D y F) o utilizando un set de filtros GFP (excitación BP 450-490, Dicroico FT 510, emisión LP 515) (paneles A, C y E). Se observa que la expresión transitoria del LeNHX4-GFP produce fluorescencia en todo el contorno de la vacuola, con fluorescencia localizada en el borde de la célula, en las zonas en las que la vacuola ocupa todo el volumen celular, quedando claramente delimitadas las zonas transvacuolares (flecha en panel A, panel B) o el núcleo (flecha en panel E).

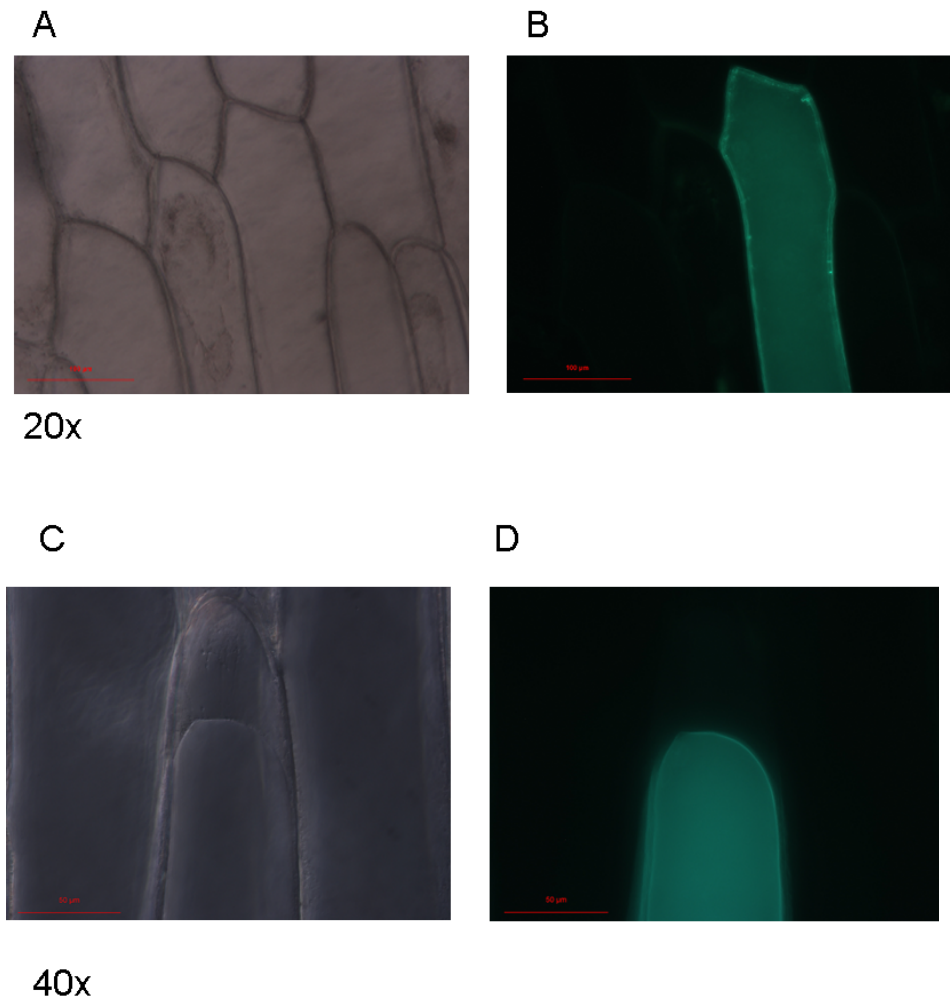
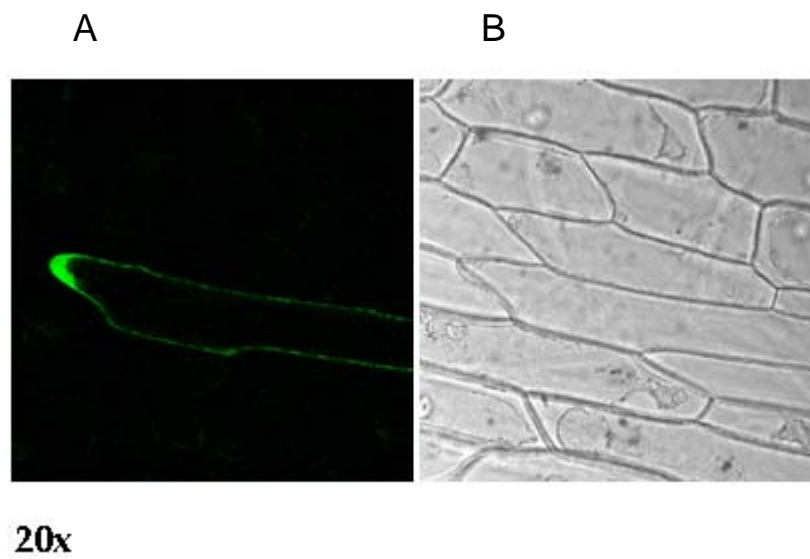


Fig R25. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla de la proteína de fusión AtNHX2-GFP visualizada en un microscopio de epifluorescencia (20x, paneles A y B y 40x, paneles C y D). Imágenes obtenidas de una única sección de células epidérmicas de cebolla utilizando luz visible (paneles A y C) o utilizando un *set* de filtros GFP (excitación BP 450-490, Dicroico FT 510, emisión LP 515) (paneles B y D). Se observa que la fluorescencia se concentra en la membrana vacuolar. Puesto que en células de epidermis de cebolla la vacuola ocupa gran parte del volumen celular, la fluorescencia sigue el contorno de la célula, aunque hay zonas en las que se distingue el contorno del tonoplasto y el de la membrana celular (paneles C y D). La construcción utilizada ha sido cedida por la Dra B. Cubero, IRNAS, Sevilla.

En las células que expresan la proteína de fusión GFP al extremo N-terminal de LeNHX4 se observa una fluorescencia uniforme en el citoplasma, indicando que la proteína no se ha insertado en la membrana y sugiriendo que el extremo N-terminal de LeNHX4 es importante para dirigir e insertar la proteína en la membrana. Si esto no ocurre, posiblemente la proteína sea degradada, liberándose GFP soluble del extremo N-terminal de la proteína de fusión (Fig. R26).



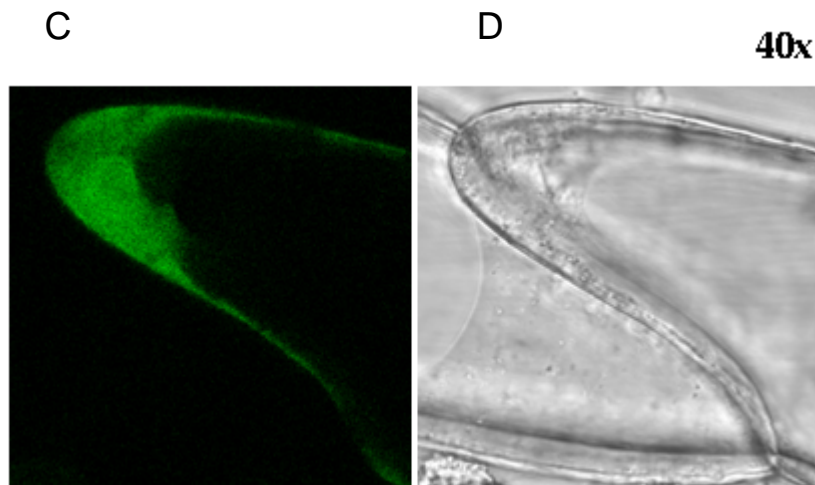


Fig R26. Expresión transitoria en células de epidermis de cebolla de la proteína de fusión GFP-LeNHX4 visualizada en un microscopio de epifluorescencia (20x, paneles A y B y 40x, paneles C y D). Imágenes obtenidas de una única sección de células epidérmicas de cebolla utilizando luz visible (paneles B y D) o utilizando un *set* de filtros GFP (excitación BP 450-490, Dicroico FT 510, emisión LP 515) (paneles A y C). Se observa que la fluorescencia se localiza uniformemente en el citoplasma, indicando que la proteína no se ha insertado en la membrana.

6. Expresión de LeNHX2 en Arabidopsis y silenciamiento de LeNHX2 en tomate

Estudios previos realizados por miembros del grupo de investigación en el que se llevó a cabo el presente trabajo condujeron a la identificación del transportador LeNHX2 en tomate, llevándose a cabo la caracterización de la proteína antiportadora expresada en levaduras, una vez purificada y

reconstituida en liposomas (Venema et al 2003). Este trabajo puso de manifiesto que LeNHX2 era un transportador endosomal K^+/H^+ , el primero descrito en plantas, y sugirió que podría desempeñar un papel en la tolerancia a salinidad y nutrición de K^+ a través del control de la homeostasis de K^+ en las células vegetales. Para corroborar esta hipótesis, en el presente trabajo se abordó el estudio de la tolerancia a la salinidad en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con una construcción para la sobreexpresión de LeNHX2 y en plantas de tomate transformadas con una construcción para el silenciamiento de este gen.

6.1. Expresión de LeNHX2 en Arabidopsis

6.1.1. Detección de las construcciones para la sobreexpresión

De entre las líneas T3 homocigóticas portadoras de una única inserción del transgen que se obtuvieron, se eligieron tres líneas al azar que se identificaron como líneas 213C, 243C y 357A. Para comprobar la presencia de LeNHX2 en las tres líneas de *Arabidopsis* utilizadas en este estudio se realizó un análisis por PCR utilizando ADN genómico extraído de la roseta de las plántulas transgénicas y cebadores específicos de LeNHX2. (Fig R27). Además, la presencia del transportador LeNHX2 fue detectada en las 20 líneas transgénicas generadas (datos no mostrados), lo que indica que el procedimiento de selección de transformantes utilizado (crecimiento en presencia de 50 mg.l^{-1} de higromicina) no daba lugar a la aparición de falsos positivos.

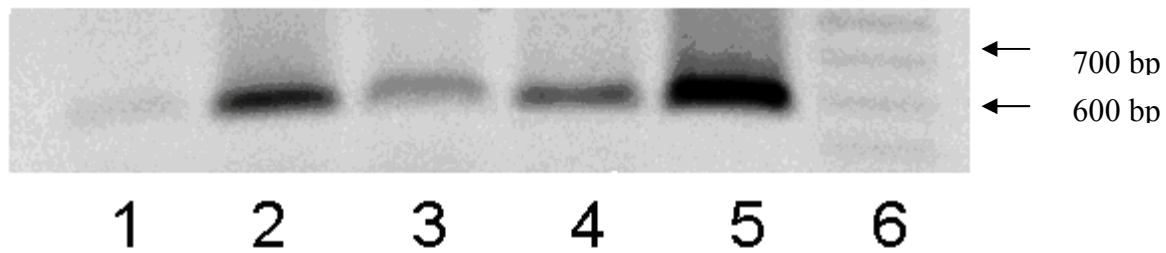


Fig. R27. Detección de LeNHX2 en plantas de *Arabidopsis* no transformadas (1) y líneas transformadas 243C (2), 213C (3) y 357A (4). Como control positivo se utilizó el vector PKV81 conteniendo la región codificante de LeNHX2 (5). En el carril 6 se cargaron los *standard* de tamaño molecular.

6.1.2. Detección inmunológica y actividad transportadora.

Con la finalidad de determinar que las tres líneas transgénicas de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo, además de haber incorporado en su genoma el transportador LeNHX2, producían la proteína codificada por dicho gen, se realizaron experimentos de inmunodetección utilizando anticuerpos que reconocen la cola de histidinas de la proteína LeNHX2. Los experimentos de *immunoblotting* demostraron que la proteína LeNHX2 estaba presente en raíces y parte aérea de plantas de *Arabidopsis* transgénicas (línea 243C) y ausente en plantas controles (Fig. R28). La detección inmunológica se realizó también para las líneas 213C y 357A, obteniéndose los mismos resultados (datos no mostrados). A efectos comparativos y como control

positivo se incluyó en los experimentos de inmunodetección la proteína LeNHX2 purificada de microsomas de levadura transformada con el gen de este transportador, observándose que tanto en levadura como en *Arabidopsis*, la proteína LeNHX2 presenta un peso molecular de 55 kDa.

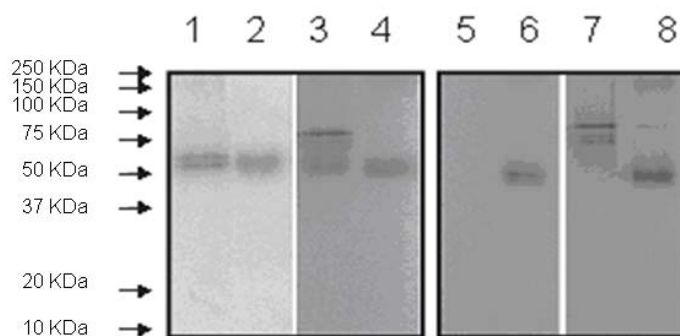


Fig. R28. Inmunodetección de LeNHX2 tras purificar la proteína a partir de membranas microsomales obtenidas de: raíces de plantas transgénicas de la línea 243C (1) y controles (5), parte aérea de plantas transgénicas de la línea 243C (3) y controles (7) y levadura transformada con el gen LeNHX2 (2, 4, 6 y 8).

La actividad antiporte (K^+,Na^+)/ H^+ fue ensayada en fracciones de membrana intracelulares de plantas de *Arabidopsis* que expresan LeNHX2 y de plantas no transformadas, basándose en la relajación del gradiente de pH creado por la H^+ -ATPasa tipo V (Fig R29). Aunque las plantas transgénicas mostraban unas tasas de transporte de protones dependiente de ATP ligeramente inferiores a los controles no transformados (Fig R29, a-d), el

cálculo de la velocidad inicial de relajación de la fluorescencia tras adicionar K_2SO_4 o Na_2SO_4 mostraba claramente que las plantas que expresan LeNHX2 exhiben una actividad de intercambio K^+/H^+ mas alta que las plantas control. La actividad de intercambio Na^+/H^+ también era más alta en las plantas transgénicas que en las control, aunque en este caso la diferencia observada era menor que la detectada para el intercambio K^+/H^+ (Fig R29e)

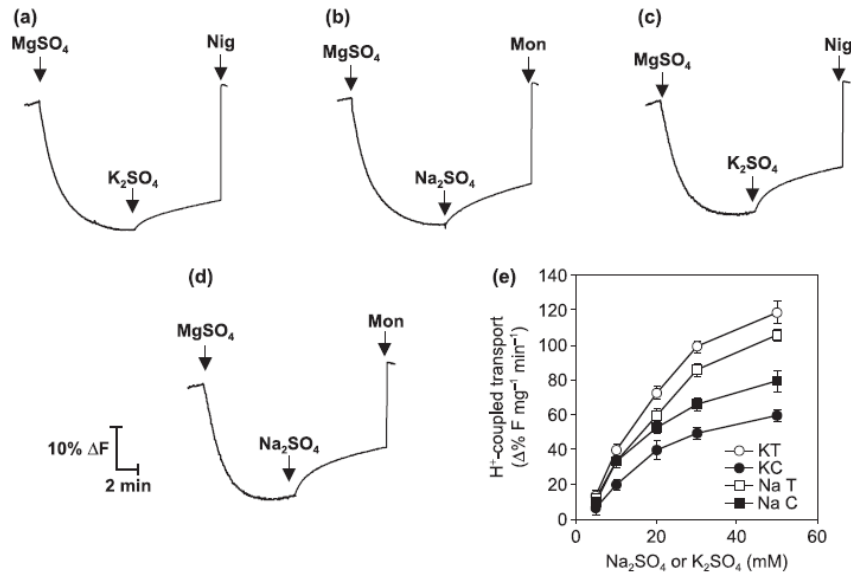


Fig R29. Actividad antiporte Cation/H⁺ en vesículas de membranas intracelulares de raíces de plantas de *Arabidopsis* no transformadas (a, b) y transgénicas (c, d) determinada por monitorización de la extinción de la fluorescencia del ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina). Inicialmente se estableció un gradiente de pH a través de las vesículas energizando la ATPasa tipo V con MgSO₄ (primera flecha). Cuando se alcanzó un gradiente de pH estable, se inició la reacción antiporte por adición de K₂SO₄ (50 mM) o Na₂SO₄ (50 mM) (segunda flecha). Finalmente, se suprimió el *quenching* de la fluorescencia por adición de Nigericina (Nig, 0.5 μM) o Monensina (Mon, 0.5 μM) (tercera flecha). Las gráficas corresponden a un experimento representativo de los tres realizados usando preparaciones de membrana independientes para cada uno de ellos. (e) Tasas iniciales de transporte de H⁺ acoplado a diferentes concentraciones de K₂SO₄ (círculos, K) y Na₂SO₄ (cuadrados, Na) en vesículas de membrana obtenidas de plantas transgénicas (símbolos de color blanco, T) y de plantas control (símbolos de color negro, C) (resultados expresados como media ± desviación estándar de tres experimentos con preparaciones de membrana independientes). La recuperación de la fluorescencia se normalizó de forma que 0 representa el nivel mínimo de fluorescencia obtenido después de la energización de la V-ATPasa, y el 100 % representa el nivel máximo de fluorescencia obtenido después de la adición de ionóforos.

6.1.3. Efecto de la sobreexpresión de LeNHX2 sobre el crecimiento y la tolerancia a la salinidad.

Inicialmente, se investigó en qué medida la sobreexpresión de LeNHX2 afectaba al crecimiento de las plantas transgénicas en ausencia de estrés. En la Fig. R30 se observa que no existían diferencias significativas en el crecimiento de las plantas de *Arabidopsis* no transformadas y transgénicas tras 6 semanas de cultivo en vermiculita y riego con solución de sales MS.



Fig. R30. Plantas de *Arabidopsis* no transformadas y transgénicas tras 6 semanas de cultivo en vermiculita y riego con solución de sales MS.

Teniendo en cuenta que LeNHX2 es un transportador de K^+ (Venema et al 2003), es probable de que las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan este gen presenten diferente requerimiento de K^+ para el crecimiento, así como diferente nivel de tolerancia a elevadas concentraciones de este elemento que las plantas control no transformadas. Para esclarecer este aspecto, se realizó un estudio del crecimiento, determinado pesos fresco y seco, en plantas de *Arabidopsis* sobreexpresoras de LeNHX2 desarrolladas bajo diferentes condiciones de K^+ y sometidas o no estrés por NaCl. No se observaron diferencias significativas en la germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas no transformadas y transformadas cuando éstas se cultivaban en presencia de 20 mM NO_3K (medio MS). En presencia de 100 μM de NO_3K en el medio de germinación de las semillas y cultivo de las plántulas se inhibió significativamente el crecimiento de las plantas transgénicas respecto al observado en medio MS, no afectándose el crecimiento de las plantas control no transformadas (Fig. R31, Tabla R3). El cultivo en medios provistos de 100 mM de NO_3K inhibió en mayor medida la capacidad germinativa y el crecimiento en las plántulas control que en las transgénicas (Tabla R4).

Una vez analizado el efecto del K^+ sobre el crecimiento de las plantas controles y transgénicas, se evaluó en las mismas la tolerancia al NaCl. Para ello se germinaron las semillas de plantas controles y transgénicas en placas Petri conteniendo medio MS o medio MS modificado respecto a la concentración de K^+ (100 μM NO_3K) y suplementado o no con 50 mM NaCl. Después de tres semanas de cultivo en estas condiciones las plántulas se

transfirieron a semilleros conteniendo vermiculita y se regaron con una solución de idéntica composición a la del medio utilizado para germinar las semillas (MS o MS modificado -100 μM de NO_3K - suplementado o no con 50 mM NaCl). Los resultados de la Fig. R32 y de las Tablas R5 y R6 muestran que, independientemente de la concentración de K^+ en el medio de cultivo, las plantas transgénicas crecían mejor que las controles en medios suplementados con 50 mM NaCl. Este resultado indica que la expresión del transportador LeNHX2 mejora la tolerancia al estrés salino en plantas de *Arabidopsis* transgénicas.

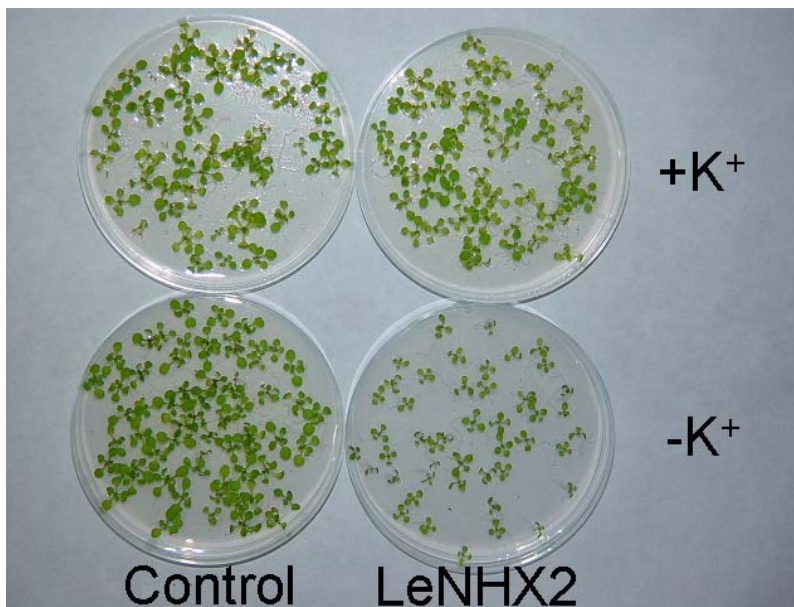


Fig. R31. Plantas de *A. thaliana* control y transgénicas (LeNHX2) cultivadas durante tres semanas en medio MS (+ K^+) o medio MS modificado respecto a la concentración de K^+ (100 μM de NO_3K) (- K^+).

Tabla R3. Pesos fresco y seco de plantas de *A. thaliana* control y transgénicas cultivadas durante 6 semanas en medio MS y en medio MS modificado respecto a la concentración de K⁺ (100 μM de NO₃K). Los resultados, expresados como g o mg / 5 plantas, son media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes, con 3 réplicas por experimento. Valores seguidos de diferentes letras difieren significativamente. (Test de Duncan P=0,05)

	Línea	Peso fresco (g / 5 plantas)		Peso seco (mg / 5 plantas)	
		Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
Medio MS	Control	11.98 ± 1.76a	0.45 ± 0.04f	1863.50 ±70.25j	39.00 ± 2.05 lm
	243C	10.08 ± 0.82a	0.54 ± 0.04e	1833.05 ±98.40j	41.00 ± 4.30 lm
	357A	9.39 ± 1.51a	0.46 ± 0.05ef	1560.25 ±95.50k	43.00 ± 7.50 lm
	213C	12.02 ± 1.07a	0.52 ± 0.03ef	1742.00 ±70.00jk	48.00 ± 6.20 l
Medio MS modificado (KNO₃ 100 μM)	Control	8.30 ± 0.80b	0.45 ± 0.05g	927.00 ± 97.60	57.05 ± 5.73n
	243C	4.51 ± 0.50c	0.26 ± 0.03h	496.00 ± 52.07	24.32 ± 3.18o
	357A	3.73 ± 0.32cd	0.22 ± 0.03hi	310.00 ± 39.20	20.08 ± 2.04o
	213C	3.44 ± 0.23d	0.20 ± 0.01i	280.00 ± 20.15	20.49 ± 2.52o

Tabla R4. Pesos fresco y seco de plantas de *A. thaliana* control y transgénicas cultivadas durante 6 semanas en medio MS modificado respecto a la concentración de K⁺ (100 mM de NO₃K). Los resultados, expresados en g o mg / 5 plantas, son media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes, con 3 réplicas por experimento. Valores seguidos de diferentes letras difieren significativamente. (Test de Duncan P=0,05)

	Línea	Peso fresco (mg / 5 plantas)	Peso seco (mg / 5 plantas)
Medio MS modificado (KNO₃ 100 mM)	Control	62.58 ± 7.43	5.00 ± 0.07
	243C	260.07 ± 22.13	23.00 ± 2.12
	357A	410.93 ± 39.42	62.00 ± 4.86
	213C	350.56 ± 37.08	45.00 ± 3.98

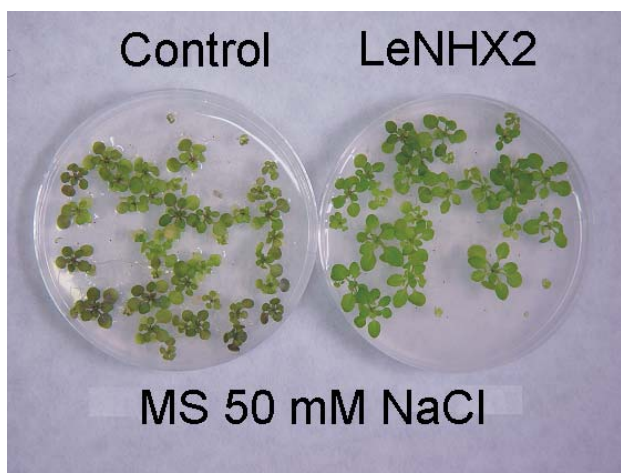


Fig. R32. Plantas de *A. thaliana* control y transgénicas (LeNHX2) cultivadas durante tres semanas en medio MS suplementado con 50 mM NaCl.

Tabla R5. Pesos fresco y seco de plantas de *A. thaliana* control y transgénicas cultivadas durante 6 semanas en medio MS suplementado con 50 mM de NaCl. Los resultados, expresados como g o mg / 5 plantas son media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes, con tres réplicas cada uno.

Línea	Peso fresco (g / 5 plantas)		Peso seco (mg / 5 plantas)	
	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
Control	3.83 \pm 0.26	0.19 \pm 0.03	492.80 \pm 67.00	25.00 \pm 2.03
243C	8.55 \pm 0.83	0.43 \pm 0.04	1050.10 \pm 97.89	53.00 \pm 4.58
357A	6.80 \pm 0.72	0.39 \pm 0.04	966.00 \pm 85.23	40.93 \pm 5.23
213C	7.65 \pm 0.65	0.42 \pm 0.03	1075.90 \pm 112.46	55.00 \pm 5.72

Tabla R6. Pesos fresco y seco de plantas de *A. thaliana* control y transgénicas cultivadas durante 6 semanas en medio MS modificado para la concentración de K^+ ($100 \mu M$ de NO_3K) y suplementado con 50 mM de $NaCl$. Los resultados, expresados en g o mg / 5 plantas son media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes, con tres réplicas cada uno.

Línea	Peso fresco (g / 5 plantas)		Peso seco (mg / 5 plantas)	
	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
Control	3.25 ± 0.38	0.27 ± 0.02	465.05 ± 55.00	38.05 ± 3.00
243C	7.15 ± 0.56	0.63 ± 0.07	902.25 ± 92.03	88.25 ± 4.75
357A	4.88 ± 0.41	0.75 ± 0.07	590.50 ± 50.46	104.40 ± 9.05
213C	5.78 ± 0.60	0.53 ± 0.04	820.30 ± 74.36	75.35 ± 6.30

6.1.4. Análisis del contenido en iones Na^+ y K^+ en *A. thaliana*

El contenido en Na^+ y K^+ de plantas controles y plantas transgénicas de *A. Thaliana* se analizó en plantas cultivadas en medio hidropónico durante cinco semanas sin (C) o con $NaCl$ 50 o 100 mM (50 y 100) y en ausencia de K^+ ($\emptyset K$) en los últimos siete días. (Fig XXX). En raíces, solo se observaron diferencias menores en el contenido de Na^+ y K^+ entre las plantas transgénicas y las controles. En las plantas sometidas a tratamiento con un suplemento en $NaCl$, se observaba en raíces un incremento de la concentración de Na^+ acompañado de una disminución en la concentración de K^+ , no habiendo diferencias significativas entre los contenidos iónicos de las plantas control y las plantas transgénicas. En la parte aérea sin embargo,

las plantas control acumulaban más Na^+ que las plantas transgénicas, mientras que el contenido en K^+ era más alto en las plantas transgénicas, mostrando una tasa K^+/Na^+ mucho mayor en la parte aérea de las plantas transgénicas cultivadas con NaCl , que en la planta control cultivada en las mismas condiciones. En condiciones de deficiencia de K^+ , el contenido en K^+ en la parte aérea se encontraba especialmente afectado. Sin embargo, la diferencia en el contenido total de K^+ entre plantas control y transgénicas no era significativa, aunque en la parte aérea de las plantas transgénicas contenía una mayor concentración de K^+ , aunque las diferencias son marginales, que las plantas control.

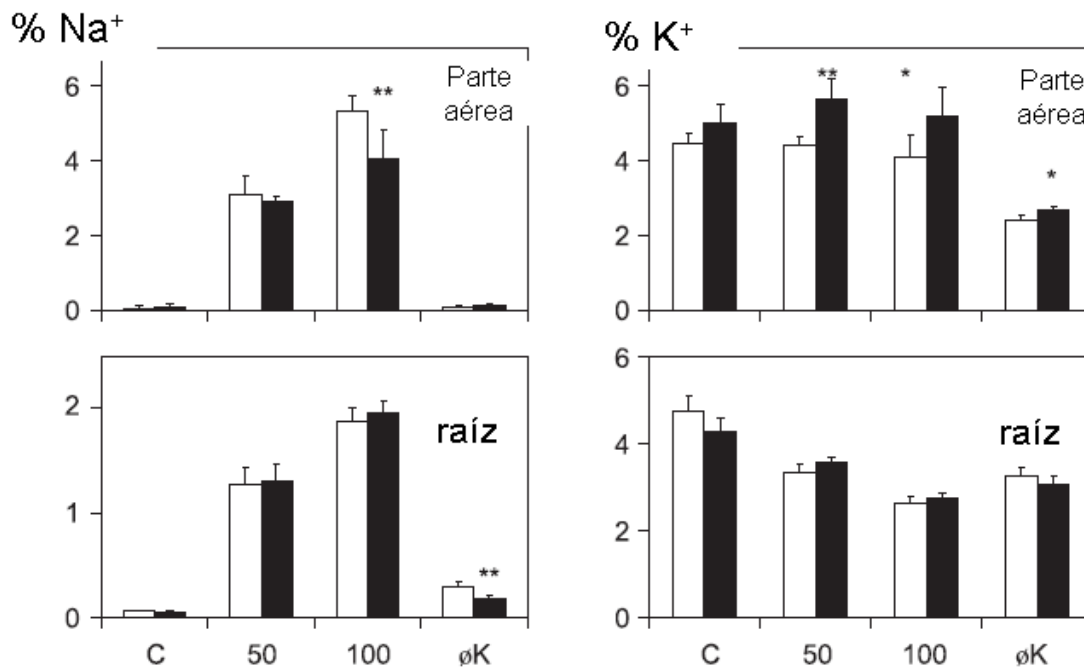


Fig 33. Contenido iónico en raíces y parte aérea de plantas de *Arabidopsis Thaliana* transgénicas y controles. El contenido iónico se determinó en raíces y en la parte aérea de la línea transgénicas 213, 243 y 357 y plantas control cultivadas en medio hidropónico durante cinco semanas sin (C) o con NaCl 50 o 100 mM(50 y 100) y en ausencia de K⁺ (øK) en los últimos siete días. Las barras blancas corresponden a los controles no transformados, las barras negras a las plantas transgénicas. Los resultados son media \pm desviación estándar de 5 experimentos independientes, con tres réplicas cada uno. Las diferencias significativas entre los controles no transformados y las plantas transgénicas están indicadas con asteriscos (Test de Duncan * $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

6.2. Silenciamiento de LeNHX2 en tomate

Se llevaron a cabo 5 experimentos independientes de transformación de cotiledones de tomate con *Agrobacterium* conteniendo la construcción para el silenciamiento del gen LeNHX2. En total se usaron para la transformación 752 segmentos de cotiledones a partir de los cuales se regeneraron 44 plantas, que posteriormente fueron analizadas por PCR para comprobar que estaban silenciadas. De estas 44 plantas, las designadas como L7, L11, L12, L14, L31 y L44 produjeron frutos con semillas. Para seleccionar a partir de ellas descendientes T1 portadores de la construcción de silenciamiento se llevaron a cabo experimentos de germinación con tres concentraciones de kanamicina (100, 150 y 200 mg.l⁻¹). Se comprobó que, en presencia de 100 y 150 mg.l⁻¹ de antibiótico, las semillas de plantas no transformadas germinaban y daban lugar a plántulas que crecían *in vitro* en el medio GM. Sin embargo, cuando el medio de germinación se suplementaba con 200 mg.l⁻¹ de kanamicina, únicamente germinaban las semillas portadoras de la construcción de silenciamiento que, además, producían plántulas que crecían *in vitro* en estos medios (Fig. R35). Por ello, la selección de plantas T1 transformadas se llevó a cabo mediante germinación de las semillas procedentes de los transformantes primarios en medio GM suplementado con 200 mg.l⁻¹ de kanamicina.

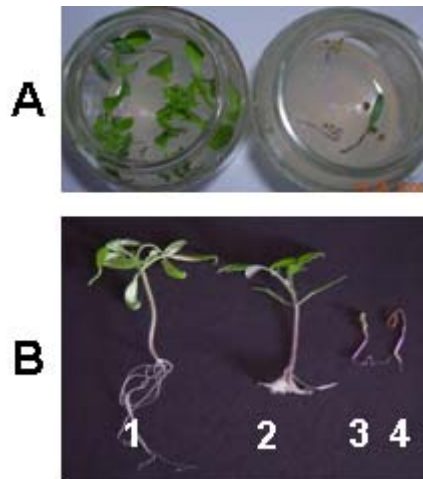


Fig. R35. A) Plántulas de tomate no transformadas cultivadas en GM sin kanamicina (izquierda) o con 200 mg.l^{-1} de kanamicina (derecha); B) Plántulas de tomate con la construcción para el silenciamiento de LeNHX2 cultivadas en GM sin kanamicina (1) o con 200 mg.l^{-1} de kanamicina (2) y plántulas de tomate no transformadas cultivadas en GM con 200 mg.l^{-1} de kanamicina (3 y 4).

6.2.1. Detección de las construcciones para el silenciamiento de LeNHX2 en las plantas transgénicas

Para comprobar la presencia de la construcción para el silenciamiento génico de LeNHX2, las 44 plantas de tomate regeneradas a partir de los explantos de cotiledón transformados fueron analizadas por PCR. Para este análisis por PCR se utilizó una pareja de cebadores específicos del plásmido pKANNIBAL (5' CTT CAT TTC ATT TCC ACA 3', 5' CCT CTT ACA CAT CAT CAC TTC 3') que se unen a ambos lados del inserto y amplifican un fragmento de 839 pares de bases (pb). Los resultados obtenidos indicaron la

presencia de la construcción génica utilizada en 14 de las 44 plantas regeneradas (líneas L1, L4, L6, L7, L9, L11, L12, L14, L20, L31, L41, L42, L43, L44) (Fig R36), lo que permite concluir que el proceso de selección de transformantes utilizado (crecimiento en presencia de 200 mg.l⁻¹ de kanamicina) da lugar a la aparición de un alto porcentaje de falsos positivos, es decir, explantos no transformados capaces de regenerar plantas en medios selectivos.

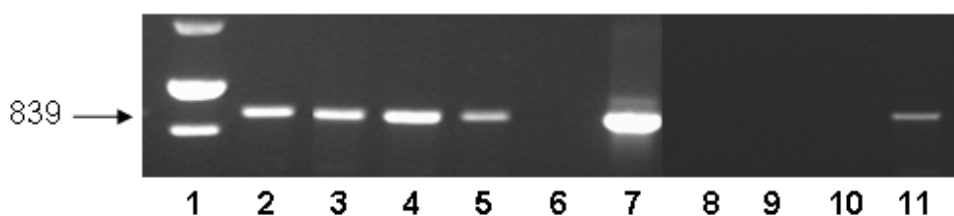


Fig. R36. Detección de la construcción para el silenciamiento de LeNHX2 en plantas de tomate. Electroforesis de los productos de PCR de las líneas L41, L42, L43 y L44 (2-5), de una planta no transformada (6), del plásmido pKV119 portador de la construcción de silenciamiento (7) y de las líneas L2, L3, L5, L6 (8-11). En el carril 1 se cargó el standard de tamaño molecular de 1 Kb.

6.2.2. Determinación de los niveles de silenciamiento génico.

Con la finalidad de determinar el nivel de silenciamiento del gen LeNHX2 en las distintas líneas transgénicas se realizaron ensayos de PCR a

tiempo real en plantas en las que se había comprobado previamente la presencia de la construcción para el silenciamiento del gen mediante PCR.

Para los estudios de PCR a tiempo real presentados en este trabajo, se llevaron a cabo dos reacciones de RT-PCR por cada muestra de RNA y dos extracciones de RNA para cada línea transgénica portadora de la construcción de silenciamiento. Los resultados obtenidos en estos ensayos presentaron una desviación típica, respecto a la media, menor del 12%. El mayor nivel de silenciamiento de LeNHX2 se observó en las líneas L1, L7, L9, L20, L31, L41, L42, L43 y L44, que presentaron un porcentaje de expresión del gen menor al 50% (Fig. R37).

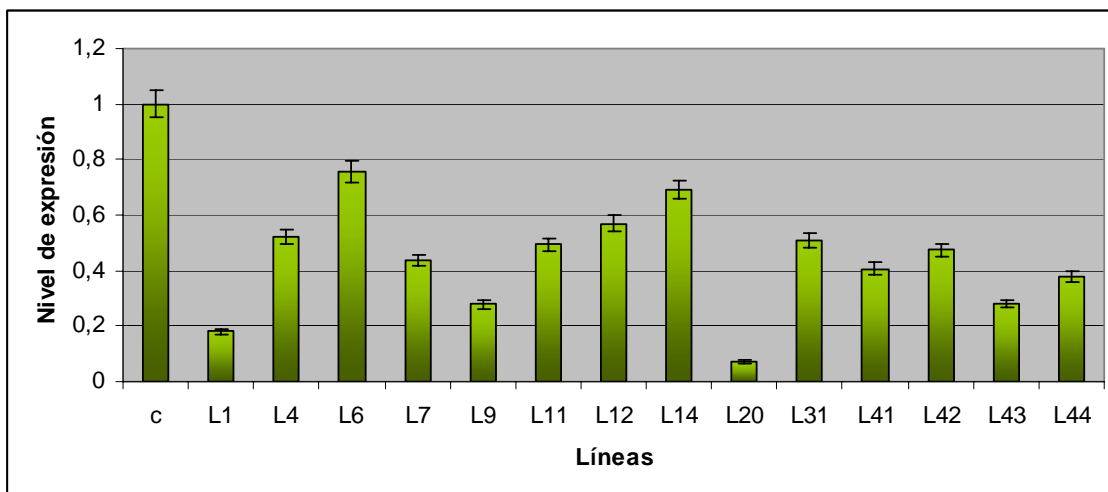


Fig. R37. Nivel de expresión del gen LeNHX2, cuantificado mediante PCR a tiempo real, en una planta no transformada (C) y en plantas transgénicas que portan la construcción para el silenciamiento (L1, L4, L6, L7, L9, L11, L12, L14, L20, L31, L41, L42, L43, L44).

6.2.3. Efecto del silenciamiento de LeNHX2 sobre el crecimiento y la tolerancia a la salinidad de las plantas transgénicas.

Se investigó en qué medida el silenciamiento de LeNHX2 afecta al crecimiento de las plantas transgénicas. En la Tabla R7 y la Fig. R38 se muestran los niveles de silenciamiento de LeNHX2 en las distintas líneas transgénicas y el crecimiento y producción de frutos y semillas por las plantas transformadas. Los resultados indican que las líneas que presentan un porcentaje de silenciamiento mayor del 70% no produjeron fruto, a excepción de la línea 20 que dió un sólo fruto. Las líneas con menor nivel de silenciamiento produjeron frutos con semillas, a excepción de las líneas 41 y 42, que llegaron a producir flores pero no frutos.

Tabla R7. Porcentaje de silenciamiento de LeNHX2 en las distintas líneas transgénicas y su relación con la producción de frutos y semillas

LÍNEA	% SILENCIAMIENTO	PRODUCCIÓN DE SEMILLAS	NÚMERO DE FRUTOS
1	81,83	NO	0
4	47,86	SÍ	4
6	24,22	SÍ	35
7	56,35	SÍ	33
9	72,26	NO	0
11	50,69	SÍ	37
12	43,16	SÍ	45
14	30,98	SÍ	40
20	92,82	SÍ*	1
31	49,30	SÍ	57
41	59,29	NO	0
42	52,53	NO	0
43	71,96	NO	0
44	61,92	SÍ	30

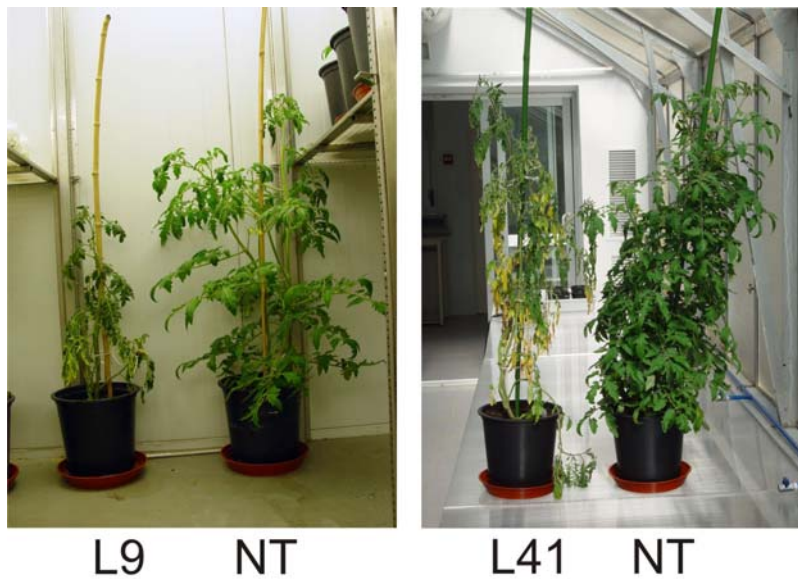


Figura R38. Plantas de tomate silenciadas (L9, L41) y no transformada (NT) cultivadas durante 2 meses en las condiciones descritas en Material y Métodos.

Estos resultados sugieren que la expresión de LeNHX2 es fundamental para el desarrollo de la planta. Para confirmar esta hipótesis se analizó el crecimiento de plantas T1 obtenidas por germinación de semillas de la línea 20, la única línea con un elevado nivel de silenciamiento de LeNHX2 de la que se obtuvieron semillas. Teniendo en cuenta que en las plantas T1 se produce la segregación de la construcción génica introducida, se preveía que las plantas L20T1 portadoras de la construcción de silenciamiento presentaran un crecimiento inhibido frente a las plantas L20T1 que no portan la construcción. En efecto, Los resultados mostrados en la Fig. R39 indican que la presencia de la construcción de silenciamiento para

LeNHX2 en la planta L20T1,1 tiene un efecto negativo sobre el crecimiento no observado en la planta L20T1,2 que, según el análisis de PCR, no presenta la construcción de silenciamiento.

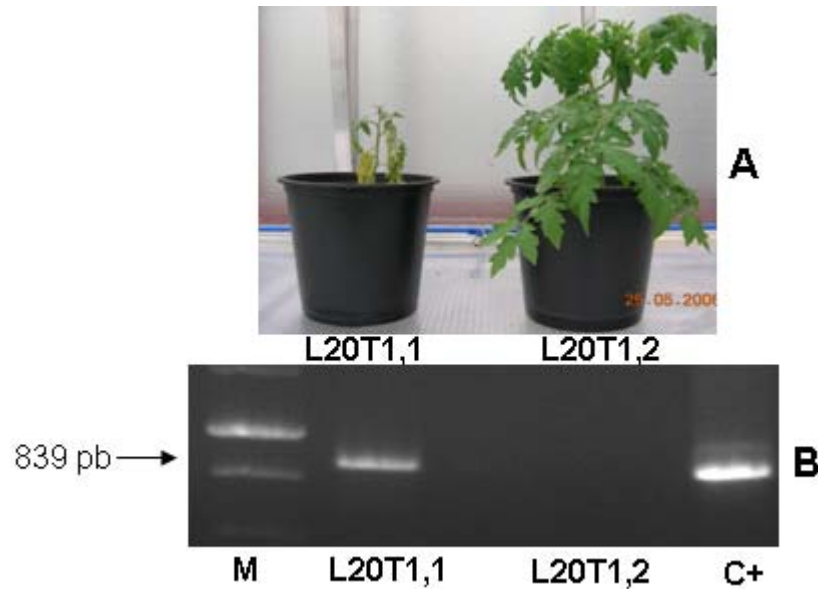


Fig. R39. A) Plantas T1 de la línea L20 (L20T1,1 y L20T1,2) cultivadas durante 1 mes en las condiciones descritas en Material y Métodos. B) Análisis por PCR de la presencia de la construcción para el silenciamiento de LeNHX2 utilizando DNA genómico de plantas L20T1,1 y L20T1,2. M, estándar de tamaño molecular de 1 Kb; C+, plásmido pKV119 portador de la construcción de silenciamiento.

Además, se ratificó por PCR a tiempo real, que el nivel de silenciamiento de LeNHX2 en la planta L20T1,1 era idéntico al detectado en el transformante primario L20 (Fig. R40).

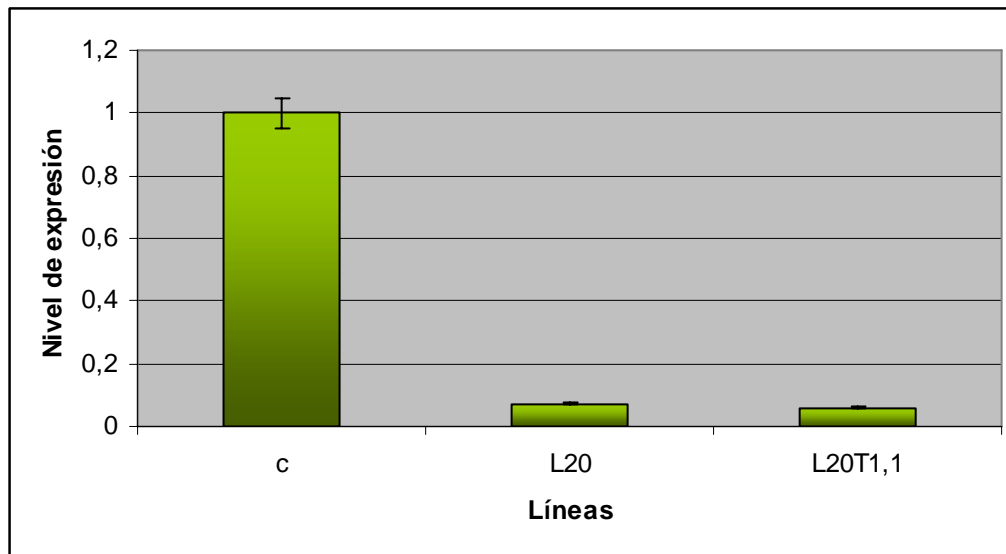


Fig. R40. Cuantificación, mediante PCR a tiempo real, de la expresión de LeNHX2 en plantas de tomate no transformadas (C) y en las líneas silenciadas L20 y L20T1,1.

Los estudios del efecto del silenciamiento del gen LeNHX2 sobre la sensibilidad al NaCl se llevaron a cabo mediante determinación de los valores de peso fresco en plantas T1 cultivadas en sistema hidropónico, suplementando la solución de cultivo con NaCl. Previamente se determinó la concentración de NaCl que provocaba una inhibición del crecimiento de la variedad de tomate utilizado analizando el crecimiento de plantas no transformadas en medios provistos de 50, 75 y 130 mM de NaCl. Se

comprobó que en las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo, la presencia de 50 y 75 mM de NaCl incrementaba el peso fresco de las plantas respecto al de controles no tratados, mientras que en medios con 130 mM de NaCl el crecimiento se inhibía (resultados no mostrados). Por ello, se eligió esta última concentración para analizar el efecto del silenciamiento de LeNHX2 sobre la tolerancia a estrés salino. Puesto que las plantas T0 con un elevado nivel de silenciamiento no producían frutos, se han utilizado para este estudio plantas T1 provenientes de plantas T0 con un nivel de silenciamiento moderado o bajo. Los resultados mostrados en la Tabla R8 y en la Fig. R42, indican una disminución del peso fresco de hoja, tallo y raíz de las plantas tratadas con 130 mM de NaCl respecto a las no tratadas en todas las plantas analizadas, si bien la inhibición por NaCl fue mayor en las líneas silenciadas que en las plantas no transformadas.

En la Fig. R42 se representa la variación porcentual del peso fresco de hojas, tallos y raíces de plantas tratadas con 130 mM de NaCl respecto de controles no tratados, comprobándose que la disminución del peso fresco causada por el NaCl es mayor en las hojas de plantas silenciadas que en las de las plantas no transformadas, de lo que se concluye una mayor sensibilidad al NaCl en las líneas silenciadas. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre ambos tipos de plantas a nivel del peso fresco de raíz y tallo. Ello puede explicarse en base al bajo nivel de silenciamiento de LeNHX2 detectado en las líneas transgénicas utilizadas para realizar este estudio. De ser esto así, cabría esperar una mayor sensibilidad al NaCl en las líneas con mayor nivel de silenciamiento génico, en las que no se pudo

realizar estas determinaciones pues los transformantes primarios con mayor nivel de silenciamiento no produjeron frutos.

Tabla R8. Peso fresco de raíces, tallos y hojas de plantas no transformadas y transformadas con la construcción para el silenciamiento de LeNHX2 cultivadas en sistema hidropónico durante 3 semanas, en ausencia y en presencia de 130 mM de NaCl durante las dos últimas semanas. Los resultados son media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes con 2 réplicas por experimento. Los datos se expresan en gramo de peso fresco por planta y en porcentaje de inhibición en el crecimiento de las plantas cultivadas con 130 mM de NaCl.

PESO FRESCO (g/planta)									
Línea	0 mM NaCl			130 mM NaCl					
	Raíz	Tallo	Hoja	Raíz	% ¹	Tallo	% ¹	Hoja	% ¹
No transformada	33.76 \pm 2.58	55.30 \pm 6.52	43.42 \pm 4.19	12.17 \pm 1.23	64	12.60 \pm 0.98	77	23.76 \pm 2.87	45
L7	19.54 \pm 1.36	41.01 \pm 4.33	34.76 \pm 2.95	7.63 \pm 0.56	61	7.20 \pm 0.78	83	17.58 \pm 2.23	49
L11	17.27 \pm 1.44	29.97 \pm 2.64	26.69 \pm 3.07	5.83 \pm 0.67	66	4.14 \pm 0.54	86	10.24 \pm 1.02	62
L12	23.57 \pm 2.42	45.38 \pm 6.01	38.22 \pm 2.66	9.59 \pm 1.22	59	7.70 \pm 1.02	83	18.04 \pm 1.60	53
L14	23.52 \pm 1.63	38.22 \pm 2.83	33.27 \pm 2.32	8.42 \pm 0.27	64	6.59 \pm 0.82	83	12.65 \pm 0.88	62
L44	15.59 \pm 1.11	26.41 \pm 2.47	23.12 \pm 2.18	6.00 \pm 0.73	62	4.41 \pm 0.41	83	8.04 \pm 0.75	65

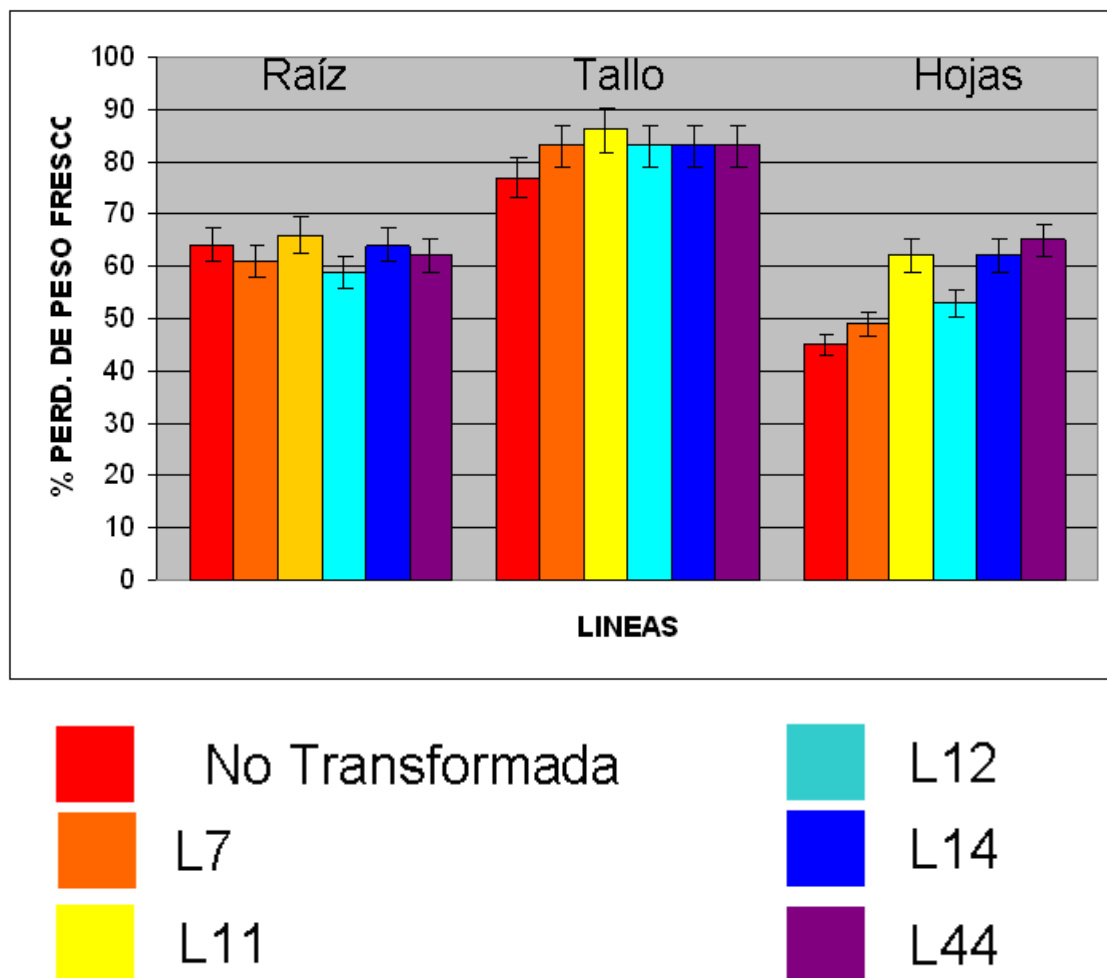


Fig R42. Peso fresco de raíz, tallo y hojas de plantas no transformadas y silenciadas (T1) de las líneas L7, L11, L12, L14 y L44 cultivadas en sistema hidropónico durante tres semanas, las dos últimas con 130 mM de NaCl. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición respecto al peso fresco de plantas no tratadas cultivadas en las mismas condiciones.

Discusión

Estudios previos llevados a cabo en el laboratorio donde se realizó esta tesis habían permitido identificar las proteínas LeNHX1 y LeNHX2 de tomate, poniendo de manifiesto que LeNHX2 es un sistema de antiporte K^+/H^+ endosomal, el primero descrito en plantas (Venema et al 2003). En estos estudios se demostró que la expresión de LeNHX2 en levadura favorece la acumulación de K^+ , pero no de Na^+ , de lo que se podría inferir que interviene en la regulación del pH, de la osmolaridad y del volumen de orgánulos o endosomas, procesos en los que interviene el K^+ como catión más importante (Venema et al 2003). Además, la caracterización de LeNHX2 en levadura indicaba que este transportador no es el ortólogo en tomate de la proteína AtNHX1 de *Arabidopsis thaliana* (Venema et al 2003).

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha continuado con la caracterización de las proteínas LeNHX1 y LeNHX2 de tomate. Además, se continuó en la búsqueda de un homólogo de AtNHX1 de *Arabidopsis*, llevándose a cabo la identificación y caracterización de nuevas isoformas de genes NHX de tomate. Así, se han clonado dos nuevos genes, LeNHX3 y LeNHX4, que codifican proteínas de 537 y 536 aminoácidos respectivamente, y que son muy cercanas a las proteínas AtNHX1 y 2 de *Arabidopsis* (Figs. A6 y R2), de forma que podrían constituir antiportadores $(Na^+/K^+)/H^+$ vacuolares con una función análoga a la descrita para AtNHX1 y AtNHX2. Las proteínas LeNHX3 y LeNHX4 son transportadores Clase I, incluidos en el grupo NHX de transportadores CPA1 junto con las proteínas AtNHX1 y AtNHX2; mientras que el transportador LeNHX2 forma parte del subgrupo Clase II

(Figs. A6 y R2). Experimentos de sobreexpresión de AtNHX1 en plantas transgénicas han puesto de manifiesto la implicación de este transportador en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Apse et al 1999, Zhang et al 2001). Puesto que LeNHX3 y LeNHX4 están cercanos a las proteínas AtNHX1 y 2 es posible que, al igual que éstas últimas, tengan un papel en la tolerancia a la salinidad. Por esta razón en este trabajo se han estudiado en profundidad estas proteínas.

Estudios de expresión en plantas. Como ya se ha mencionado en los antecedentes científicos de este trabajo, el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés salino depende de la adecuada translocación y redistribución de Na^+ y K^+ en los distintos tejidos de la planta. Puesto que los transportadores NHX intervienen en la acumulación de Na^+ y K^+ , hemos estudiado el patrón de expresión de los genes LeNHX, a fin de evaluar su papel en la respuesta a la salinidad en tomate. Las isoformas LeNHX1, LeNHX 2 y LeNHX 3, al igual que AtNHX1 y AtNHX2 (Yokoi et al 2002, Shi y Zhu 2002; Apse et al 2003), parecen tener una expresión similar en raíces, tallo, hojas, flores y frutos en ausencia de estrés salino (Fig R3, R6-R9). LeNHX4 mostró una expresión diferencial en los distintos tejidos, encontrándose altamente expresado en flores y frutos (Fig R3), lo que podría estar relacionado con una función específica de esta proteína. También las isoformas LeNHX2 y LeNHX3 mostraron niveles de expresión algo más elevados en flor (Fig R3). El alto nivel de expresión de estas isoformas LeNHX en conocidos sumideros de potasio 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. Del mismo modo, la proteína InNHX1 de *Ipomea Nil* fue encontrada principalmente en flores, donde determina su color por cambios en el pH vacuolar (Fukuda et al 2004b) y la proteína VvNHX1 de uvas, muestra altos niveles de expresión en fruto maduro, donde parece estar implicada en la acumulación de K^+ y la extensión vacuolar durante la maduración (Hanana et al 2007).

Se ha demostrado que especies de tomate relativamente tolerantes a la salinidad acumulan más sal en la parte aérea que algunas especies más sensibles. En este trabajo se ha comparado la especie de tomate silvestre tolerante a la salinidad *Solanum pimpinelifolium* con la especie cultivada sensible *S. lycopersicum* cv. Volgogradskij. Estudios previos habían demostrado que la mejor adaptación al estrés salino de la especie tolerante está asociada al mantenimiento de influjos de Na^+ y K^+ más altos, lo que posibilitaría un ajuste osmótico más rápido (Guerrier 1996). Esta mayor acumulación de Na^+ o K^+ en la especie tolerante comparada con la sensible podría estar relacionada con la inducción por NaCl de la expresión de algún transportador de tipo NHX. En esta tesis hemos confirmado los resultados de Guerrier (1996), comprobando que la especie *Solanum pimpinelifolium* es más tolerante a la salinidad que la especie *S. lycopersicum* cv. Volgogradskij, ya que los tratamientos salinos utilizados no afectan significativamente al crecimiento de la especie tolerante y sí al de la especie sensible (Fig R4, Tabla R2). En respuesta a estrés salino, ambas especies acumulan Na^+ , fundamentalmente en la parte aérea, especialmente en los tallos (Fig R5). En

concordancia con los resultados de Guerrier (1996), hemos encontrado que la especie tolerante *Solanum pimpinelifolium* acumula más Na^+ que la especie sensible *S. lycopersicum* cv. Volgogradskij, tanto en tratamientos salinos de corta duración, como en tratamientos salinos de larga duración (Fig R5). En la especie tolerante se acumula más Na^+ en raíz que en la especie sensible en respuesta a un estrés salino. La especie tolerante además mantiene niveles de K^+ más altos en raíz en respuesta a estrés salino que la especie sensible, mientras que en ésta última los niveles de K^+ son más altos en tallo. Posiblemente en la especie tolerante parte del K^+ de la parte aérea pueda ser sustituido por Na^+ , disminuyendo así la necesidad de transportar K^+ desde la raíz hacia la parte aérea.

En general, las isoformas NHX estudiadas se inducen por estrés salino con un patrón similar en las especie sensible y tolerante, si bien los niveles de inducción son más elevados en la especie tolerante, sugiriendo la implicación de los transportadores NHX en la mayor acumulación de Na^+ en la especie tolerante (Figs R6, R7, R8 y R9). La isoforma LeNHX2 se expresan fundamentalmente en raíz y se induce de manera significativa en condiciones de estrés salino (Fig R7); mientras que LeNHX4 se inducen por NaCl sobre todo en parte aérea (Fig R9) y LeNHX1 y LeNHX3 aumentan su expresión a nivel de la planta entera en condiciones de estrés salino (Figs R6 y R8). LeNHX2 se induce fuertemente en raíces de la especie tolerante, y podría estar implicado en el mayor contenido en Na^+ y K^+ en raíces de *S. pimpinelifolium* en condiciones de estrés. La expresión de la isoforma LeNHX4 tiene tendencia a disminuir con el estrés salino en tallo, sobre todo

en la especie tolerante, mientras que se induce fuertemente en hojas. El gen LeNHX3 solamente se induce por estrés de 7 días. Todos estos resultados indican funciones específicas para cada isoforma en tejidos distintos en respuesta al estrés salino. La mayor inducción por sal de los genes LeNHX y la mayor acumulación de Na⁺ y K⁺ en la especie tolerante están en concordancia con el papel fundamental que pueden jugar los genes LeNHX en la respuesta al estrés salino mediante acumulación en vacuolas de Na⁺ y K⁺. Zahran y colaboradores (2007) también demostraron una correlación positiva entre la acumulación de Na⁺ y la expresión de genes NHX. Estos autores, detectaron una mayor acumulación de Na⁺ en la leguminosa glicófita *Medicago intertexta* que en la especie halofítica relacionada *Melilotus indicus* cuando ambas eran cultivadas en condiciones de salinidad, demostrando que el fenotipo sensible acumulador se asociaba a una inducción por NaCl de la expresión de transportadores NHX. Comparando variedades de maíz que se diferencian en su tolerancia a sal, se ha observado que los transcritos de NHX son sólo inducidos en las raíces de una variedad conocida por excluir Na⁺ de la parte aérea (Zörb et al 2004).

Estudios de complementación en levadura. Se ha demostrado que los genes NHX de plantas pueden complementar la sensibilidad a sal provocada por la disrupción del gen ScNHX1 en levadura (Gaxiola et al 1999; Quintero et al 2000; Venema et al 2003). Además, la disrupción del gen ScNHX1 causa sensibilidad a higromicina, lo que estaría relacionado con un papel de ScNHX1 en la regulación del pH endosomal y biogenesis de la vacuola y

prevacuola (Mukerjee y col 2006). Se ha demostrado que la expresión de AtNHX1 en levadura complementa esta sensibilidad a higromicina (Fig R10; Gaxiola et al 1999; Quintero et al 2000), lo que sugiere que las proteínas NHX de plantas podrían tener un papel similar a ScNHX1. En este trabajo también hemos demostrado que LeNHX2 y LeNHX4 también complementan los fenotipos causados por la disrupción de ScNHX1, lo que sugiere que estas proteínas podrían tener una función similar a la descrita para AtNHX1 (Fig R10). Sin embargo, LeNHX1 y LeNHX3 no complementan la sensibilidad a Higromicina (Fig R10). En el caso de LeNHX1 tampoco hemos podido demostrar la presencia de la proteína en microsomas de levadura, lo que podría deberse a errores en la secuencia del gen LeNHX1 expresado en la levadura, que provocan la ausencia o la degradación de la proteína. Para solventar este problema, se han clonado LeNHX1 y LeNHX3 varias veces a partir de la genoteca, pero siempre se han obtenido los mismos resultados. Sin embargo, no se puede descartar que los problemas sean debidos a errores en las secuencias presentes en la genoteca. Sí se pudo demostrar la presencia de la proteína LeNHX3 en microsomas de levadura (Fig R16) y aunque no complementaba la sensibilidad a higromicina, se observó que confería un pequeño incremento en la tolerancia a NaCl a la cepa de levadura AXT3 (Fig R11). Se obtuvieron los mismos resultados cuando se expresó en levadura la proteína LeNHX3 desprovista de la cola de histidinas.

La regulación del pH por transportadores NHX probablemente depende más del K⁺ que del Na⁺, menos relevante fisiológicamente. En este sentido, la actividad de intercambio K⁺/H⁺ parece ser un rasgo universal de

los transportadores NHX intracelulares (Brett et al 2005; Mukerjee et al 2006). Así, el hecho de que cepas de WX1 transformadas con LeNHX2 y LeNHX4 sean capaces de crecer a concentraciones de hasta 700 mM de KCl, nos lleva a pensar que puede actuar como antiportadores K^+/H^+ en vacuolas o prevacuolas (Fig R12).

Por otro lado se detectó que ningún gen de la familia NHX de tomate podía complementar el fenotipo causado por la disrupción de SckHA1 en levadura (Fig R13). SckHA1 es un antiportador de la familia CPA que ha sido localizado en la membrana del Golgi, donde catalizaría el intercambio K^+/H^+ y estaría implicado en la tolerancia a un déficit de K^+ en condiciones de pH alcalino (Ramírez et al 1998; Maresova y Sychrova 2005).

Se ha comprobado mediante western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce el epítipo presente en la cola de histidinas, que LeNHX2, 3 y 4 se pueden expresar en levaduras (Fig R16). LeNHX3 y LeNHX4 tienen un tamaño similar a la proteína AtNHX1, pero son ligeramente más pequeñas que LeNHX2. Puesto que todos los antiportadores tienen un número de aminoácidos similar, esto se debería a modificaciones postraduccionales, como indica también la apariencia difusa y en varias bandas de las proteínas LeNHX3 y 4 o AtNHX1 en los experimentos de inmunodetección (Fig R16). Ello podría estar relacionado con la ausencia de complementación por parte del LeNHX3. Sin embargo, este fenómeno podría representar un artefacto de la expresión en levadura, puesto que los mecanismos de modificación postraduccional pueden ser distintos en levaduras y plantas. Así mismo es posible que la falta de complementación por LeNHX3 esté causada por la

ausencia de otros mecanismos de regulación de la actividad de esta enzima en levadura, o por ausencia de expresión en los compartimentos correctos (Fig R21).

La cola de histidinas parece afectar a la complementación en levadura en el caso de LeNHX2, pero no de LeNHX4 (Figs. R14 y R15). Sin la larga cola V5-H6 del vector pYES-DEST52, la proteína LeNHX2 es más activa que LeNHX4, mientras que la complementación es similar en presencia del *tag*. Esto podría indicar que el extremo C-terminal de LeNHX2 está implicado en la regulación de la actividad de este transportador y que LeNHX4 está presente en un estado poco activo, posiblemente provocado por la ausencia de mecanismos de regulación de la actividad de este transportador en levadura.

Determinación de la actividad de intercambio Cation/H⁺ de las proteínas NHX de tomate expresadas en levadura. Los transportadores NHX de tomate expresados en levadura, se purificaron y reconstituyeron en liposomas, al objeto de evitar interferencias con otros transportadores de iones en las medidas de actividad. Se utilizaron proteínas provistas del *tag* corto de histidinas (RGSH10) con el fin de interferir lo menos posible con la actividad de las enzimas. Los resultados obtenidos respecto a la actividad de AtNHX1 y LeNHX2 confirmaron los obtenidos en estudios previos (Venema et al 2002, 2003). Así, observamos una actividad de intercambio Na⁺/H⁺ y K⁺/H⁺ similar para la proteína AtNHX1, mientras que la proteína LeNHX2 exhibió sobre todo actividad de intercambio K⁺/H⁺ (Fig R28). LeNHX2 es el

único transportador NHX de Clase-II de plantas cuya actividad se ha determinado, habiéndose sugerido que interviene en la regulación del pH endosomal y la homeostasis de K^+ (Venema et al 2003). Al igual que AtNHX1, otros antiportadores de Clase-I, como VvNHX1 muestran una afinidad similar para K^+ y Na^+ cuando la actividad se determina en membrana vacuolar de levadura que expresa el transportador de plantas (Hanana et al 2007).

Comparado con LeNHX2 o AtNHX1, la actividad de LeNHX4 y, sobre todo, LeNHX3, es muy baja (Fig R28). En este sentido, la actividad de los antiportadores se correlaciona bien con los resultados obtenidos en los estudios de complementación, ya que tanto LeNHX3 como LeNHX4 son menos eficientes que LeNHX2 provisto del tag RGS10 (Fig R10-R12, R14, R15). LeNHX4 cataliza el antiporte Na^+/H^+ y K^+/H^+ con similar afinidad (Fig R18) y aunque su actividad es más baja que la de AtNHX1, la afinidad para Na^+ y K^+ es más alta en el caso de LeNHX4, con valores de K_m de 69 y 55 mM para el Na^+ y K^+ , respectivamente, que en el caso de AtNHX1, con valores de K_m de 129 y 126 mM para el Na^+ y K^+ , respectivamente.

Para las proteínas LeNHX2 y LeNHX4 se determinó la especificidad iónica con mayor detalle. De acuerdo a resultados ya publicados, la actividad de LeNHX2 era más alta en presencia de K^+ que en presencia de Na^+ . También de acuerdo con datos publicados, las actividades en presencia de Cs^+ y, sobre todo, Li^+ eran mucho más bajas para la proteína LeNHX2 (Fig. R19). Cabe destacar la baja actividad de LeNHX2 en presencia de Rb^+ , ya que el Rb^{86+} ha sido utilizado como análogo del K^+ para el estudio del transporte

de este ión por las proteínas NHX (Numata et al 2001, Brett et al 2005). En cuanto a LeNHX4, también ocurre que la actividad en presencia de Li^+ o Cs^+ es más baja que en presencia de Na^+ o K^+ , aunque las diferencias son más pequeñas (Fig. R19). Se puede afirmar que la familia de proteínas NHX intracelulares catalizan un relativamente no-específico antiporte K^+/H^+ y Na^+/H^+ , siendo este antiporte menos específico para el Na^+ que el de las proteínas NHE de la membrana plasmática.

Localización subcelular de LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4. Los estudios de expresión transitoria en células epidérmicas de cebolla mostraron la localización de LeNHX2 en pequeñas vesículas, lo que es indicativo de una ubicación prevacuolar o endosomal (Fig R20) y, aunque la localización exacta no ha sido aún determinada, claramente difiere del patrón observado para AtNHX1 o AtNHX2, que están presentes en la membrana vacuolar (Yokoi et al 2002). El modelo de localización determinado para la proteína LeNHX2 era idéntico al observado para AtNHX5 (Pardo et al 2006). Estos resultados confirman los obtenidos en los estudios inmunolocalización de LeNHX2 por western blot en membranas de levadura, en los que se observó el cofraccionamiento de la proteína LeNHX2 funcional con los marcadores de Golgi y los marcadores prevacuolares (Venema et al., 2003). Estas observaciones indican que las proteínas NHX de Clase II de plantas tienen una localización endosomal/prevacuolar similar a la observada para otras proteínas NHX de distinta procedencia (Pardo et al 2006). Así, se ha descrito una localización prevacuolar de la proteína de levadura ScNHX1, lo que

sugiere que ScNHX1 y LeNHX2 podrían tener funciones similares en levadura y en tomate, respectivamente. Esta función sería diferente a la de las isoformas humanas NHE6 y NHE9 encontradas en endosomas de reciclaje (Brett et al 2005, Nakamura et al 2005) y NHE7 y NHE8 localizadas en vesículas del trans o mid-trans Golgi (Numata y Orłowski 2001; Nakamura et al 2005).

En el caso de LeNHX4, los estudios de expresión transitoria en las células epidérmicas de cebolla muestran una localización de la fluorescencia de LeNHX4:GFP (GFP fusionado en el extremo C-terminal) restringida al contorno de la célula, excepto en sitios donde el tonoplasto está separado de la periferia de la célula por el núcleo. Además, se ha observado que las membranas transvacuolares que atraviesan la célula también presentan fluorescencia (Fig R24). Estos resultados demuestran la localización vacuolar de LeNHX4, pues la gran vacuola de las células epidérmicas determina que la mayor parte del citoplasma se restrinja a una capa delgada periférica. Los estudios de localización de LeNHX4 han mostrado un modelo de localización subcelular similar al descrito para AtNHX1 y ATNHX2 (Apse et al 1999; Quintero et al 2000; Yokoi et al 2002), con lo que se puede afirmar que LeNHX4 es un antiportador de tonoplasto que probablemente funciona en la acumulación vacuolar de iones, necesaria para la regulación del volumen de la célula y la detoxificación del Na⁺ citosólico.

La expresión transitoria LeNHX4 con GFP fusionado en el extremo N-terminal daba lugar a una fluorescencia uniforme a nivel del citoplasma, indicando que la proteína estaba presente en el citoplasma (Fig R26). Ello

podría explicarse en base a un papel del extremo N-terminal de LeNHX4 en el reconocimiento del lugar al que se debe anclar la proteína transportadora, de forma que al fusionarse GFP al extremo N-terminal de LeNHX4 se impediría la inserción del transportador en la membrana. Por otra parte, es posible que la proteína de fusión no presente una conformación estable. La degradación de la proteína daría lugar a la liberación de GFP de la parte N-terminal. Cabe destacar que tampoco hemos podido detectar las proteínas LeNHX3 y LeNHX4 provistas de un *tag* de histidinas N-terminal en microsomas de levaduras que expresan estas construcciones, lo que indica que la correcta conformación del dominio N-terminal es fundamental para la expresión estable de las proteínas NHX.

En el caso de LeNHX3, los experimentos de localización con LeNHX3:GFP (GFP unido al extremo C-terminal) no han sido concluyentes, ya que en la mayoría de los casos la expresión de la proteína de fusión parecía ser tóxica dando lugar a células muertas (Fig R23). Solamente en un caso se han obtenido imágenes de una célula transformada en que se ha podido detectar fluorescencia. Estas imágenes indican que la proteína se encuentra en el aparato de Golgi (Fig R21), en analogía a las isoformas NHE7 y NHE8 humanas (Numata y Orłowski 2001; Nakamura et al 2005). Esta localización podría ser un artefacto producido por anomalías en el procesamiento de la proteína de fusión, que además causarían la toxicidad de dicha proteína (Figs. R21-23).

Expresión de LeNHX2 en Arabidopsis. Aunque el gen LeNHX2 expresado en levadura mejora la tolerancia a la salinidad, en nuestro laboratorio se ha demostrado que las células de levadura que expresan LeNHX2 acumulan K^+ y no Na^+ en compartimentos intracelulares y que esta proteína cataliza el intercambio K^+/H^+ *in vitro* (Venema et al 2003).

Para analizar más profundamente la función de LeNHX2 en la tolerancia a la salinidad y nutrición de K^+ en plantas, en este trabajo hemos llevado a cabo estudios de sobreexpresión en *Arabidopsis* y de silenciamiento génico en tomate.

Mediante análisis por western blot de membranas microsomales se ha confirmado que el transportador LeNHX2 expresado en *Arabidopsis* tiene el mismo tamaño molecular que el detectado en levaduras que expresan este gen (Fig. R28; Venema et al 2003). La actividad de transporte iónico de LeNHX2, determinada en vesículas de membranas intracelulares purificadas a partir de microsomas de raíces de plantas *A. thaliana* transgénicas (Fig R29) confirma los resultados obtenidos en proteoliposomas reconstituidos con LeNHX2 purificado de microsomas de levadura (Venema et al 2003). Ambas observaciones permiten concluir que LeNHX2 principalmente cataliza el antiporte K^+/H^+ . En la fracción de endomembranas aislada de las plantas transgénicas, la actividad de intercambio K^+/H^+ es aproximadamente el doble de la actividad detectada en la fracción de endomembranas de las plantas control, mientras que el intercambio Na^+/H^+ es sólo un 30 % mayor (Fig R29e). En términos absolutos, la actividad de intercambio K^+/H^+ se incrementa dos veces más que la actividad de intercambio Na^+/H^+ en

vesículas obtenidas de plantas que sobreexpresan LeNHX2 con respecto a las plantas control. Se puede concluir entonces que la proteína LeNHX2 funciona principalmente como un antiporte K^+/H^+ en plantas, aunque sin dejar de considerar que la expresión heteróloga del gen podría modificar la selectividad iónica. El hecho de que la actividad antiporte sea mayor en membranas de plantas transgénicas que en las de plantas control indica que LeNHX2 está presente de una forma significativa como proteína funcional en la fracción de membranas subcelulares aislada. Todos estos resultados indican que no hay diferencias en la localización y características moleculares de la proteína LeNHX2 expresada en levadura y en plantas y refuerzan la hipótesis de que LeNHX2 está implicado en la regulación del pH y de la concentración de K^+ intracelular o endosomal, teniendo un efecto indirecto sobre la tolerancia a la salinidad a través del control que ejerce sobre los parámetros anteriores.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el antiportador LeNHX2 crecían igual que las plantas control en medio MS (Fig R30) pero en condiciones limitantes de K^+ , el crecimiento estaba algo inhibido (Fig. R31, Tabla R3). Ello podría ser debido a que cuando la disponibilidad de K^+ es baja (100 μ M de KNO_3), las concentraciones de K^+ vacuolar tienden a disminuir para mantener la concentración de K^+ citoplasmático mediante eflujo de K^+ de la vacuola (Walker et al 1996). En estas condiciones, el transporte de K^+ desde el citosol a compartimentos intracelulares por la proteína LeNHX2, provocaría un déficit de K^+ en el citoplasma de las plantas transgénicas que tendría consecuencias negativas sobre el crecimiento de las

mismas. El efecto negativo de elevadas concentraciones de K^+ sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* ya había sido observado por Zhu y colaboradores (1998), quienes habían puesto de manifiesto que cuando plantas de 4 días eran transferidas a medios MS suplementados con 125 mM de KCl, se producía una inhibición del crecimiento radicular en torno al 50 % después de 7 días. El hecho de que en las plantas de *Arabidopsis* que expresan LeNHX2 el efecto inhibitorio de 100 mM de KNO_3 sobre el crecimiento sea inferior al observado en las plantas controles (Tabla R4) indica que estas plantas controlan mejor la homeostasis de K^+ , de forma que cuando los niveles de K^+ externos son elevados, la proteína LeNHX2 podría transportar el exceso de este ión a compartimentos intracelulares donde quedaría almacenado, manteniéndose así la concentración de K^+ citoplasmática. También se observó que las plantas transgénicas que sobreexpresan LeNHX2 presentan mayor tolerancia al estrés salino que las plantas control no transformadas (Fig. R32, Tablas R5 y R6). La mayor capacidad de acumular K^+ de las plantas transgénicas sería beneficiosa en condiciones de estrés salino, ya que permitiría el ajuste osmótico de las células y el mantenimiento de un potencial hídrico más bajo, favoreciendo una mayor toma de agua en condiciones salinas (Lohaus et al 2000). Se puede afirmar como conclusión que las plantas transgénicas sobreexpresoras de LeNHX2 son más tolerantes al estrés salino y son capaces de acumular más K^+ (fig R33). Como las plantas que sobreexpresan LeNHX2 también presentan una mayor actividad de intercambio Na^+/H^+ a nivel de endosomas, la mayor tolerancia a sal podría

ser también consecuencia del secuestro del Na^+ en el interior de endosomas/prevacuolas.

Silenciamiento de LeNHX2 en tomate. Para silenciar el gen LeNHX2, se ha usado un fragmento de 613 pares de bases del extremo C-terminal, ya que este fragmento muestra una homología solo de entre un 47-50 % con el resto de miembros conocidos de la familia de LeNHX. Por tanto, no es previsible que los fenotipos observados en las plantas silenciadas sean debidos al silenciamiento inespecífico de otras isoformas de NHX, distintas a LeNHX2 (Kumar et al 2006). No obstante, LeNHX2 es muy similar a los antiportadores endosomales AtNHX5 y AtNHX6 de *A. thaliana*, con un 72 y un 70 % de identidad, respectivamente, por lo que no se puede excluir la posibilidad de que el fragmento usado para silenciar este gen en tomate cause además el silenciamiento de alguna isoformas endosomal de LeNHXs no conocidas.

Se han obtenido un total de 14 transformantes primarios independientes (T0), pudiéndose observar una correlación clara entre el grado de silenciamiento del gen LeNHX2 y el crecimiento general de las plantas (Fig. R38). Comparadas con plantas control, las plantas que mostraron un alto grado de silenciamiento eran extremadamente sensibles a la solución de sales de riego, por lo que ésta que diluirse 1/8 para regar las plantas silenciadas. El empleo de soluciones nutritivas no diluidas dio lugar al marchitamiento de las plantas silenciadas, lo que sugiere que el silenciamiento del gen podría conducir a alteraciones en la homeostasis iónica. La mayor parte de plantas que presentan un fuerte silenciamiento de

la expresión de LeNHX2 no produjeron o produjeron muy pocos frutos (Tabla R7). En sólo un caso se pudieron obtener plantas T1 de una línea fuertemente silenciada, en las cuales se confirmaron los efectos del silenciamiento de LeNHX2 sobre el crecimiento general de la planta (Fig. R39). Los fenotipos observados en las plantas silenciadas indican que LeNHX2 juega un papel fundamental en el desarrollo de la planta, afectando a su crecimiento y a la producción de frutos y semillas. Estudios fisiológicos han mostrado que el K^+ juega un papel importante en la carga y descarga del floema, estimulando el transporte de nutrientes hacia tejidos sumidero, especialmente en tomate, donde el K^+ es esencial para el desarrollo y la producción de frutos (Usherwood, 1985; Marschner, 1995). En este sentido, la perturbación de la homeostasis de K^+ podría explicar el fuerte efecto que tiene el silenciamiento de LeNHX2 sobre la formación de frutos.

Precisamente el hecho de que el silenciamiento de LeNHX2 afectara de forma considerable a la producción de frutos y semillas, dificultó la evaluación de la sensibilidad al NaCl en las líneas fuertemente silenciadas y sólo fue posible realizar este estudio en plantas moderadamente silenciadas de la generación T1. Utilizando estas plantas, se demostró que el silenciamiento de LeNHX2 incrementa la sensibilidad al estrés por NaCl, como se observa al comparar el peso fresco de hojas y tallos de plantas silenciadas y plantas control (Tabla R8 y Fig R42).

Bibliografía

Alberico GJ, Cramer GR. 1993. Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? I. Preliminary screening of seven maize cultivars. *Journal of Plant Nutrition* **16**: 2289–2303.

Albinsky D, Masson J, Bogucki A, Afsar K, Vass I, Nagy F, Paszkowski J. 1999. Plant responses to genotoxic stress are linked to an ABA/salinity signalling pathway. *Plant J.* **17**, 73-82

Ali R, Brett CL, Mukherjee S, Rao R. 2004. Inhibition of sodium/proton exchange by Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J Biol Chem*; **279**: 4498-4506

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 Physiology* **126**: 1061–1071

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.

Andrew PG. 1992. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome *Plant Molecular Biology* **20**: 1203-1207

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⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*; **285**: 1256-1258.

Apse MP, Blumwald E. 2007. Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* **581**: 2247-2254

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

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.

Balibrea ME, Cuartero J, Bolarin MC et al. 2003. Sucrolytic activities during fruit development of Lycopersicon genotypes differing in tolerance to salinity. *Physiologia plantarum* **118**, 38-46

Ball MC. 1988. Salinity tolerance in the mangroves *Aegiceras corniculatum* and *Avicennia marina*. I. Water use in relation to growth, carbon partitioning, and salt balance. *Aust. J. Plant Physiol.* **15**, 447-464.

Ballesteros E, Blumwald E, Donaire JP, Belver A. 1997 Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast enriched vesicles isolated from sunflower roots induced by salt stress. *Physiol Plant* ; **99**:328-334.

Bañuelos MA, Garcíadeblas B, Cubero B, Rodríguez-Navarro A. 2002 Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol* **130**:784–795

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. *Journal of Experimental Botany*. **58**, 2839-2849.

Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, Schumaker KS, Grillo S, Zhu JK. 2007. SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol Cell Biol*; **27**: 7781-7790.

Bayuelo-Jimenez JS, Debouck DG, Lynch JP 2003. Growth, gas exchange, water relations and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crops Res.* **80**, 207-222.

Benito B, Rodríguez-Navarro A. 2003 Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* **36**:382–389

Berthomieu P, Conejero G, Nublat A, Brackenbury WJ, Lambert C, Savio C, et al. 2003. Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* **22**, 2004-2014.

Bhandal IS, Malik CP. 1988. Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *International Review of Cytology* **110**: 205–254.

Binzel ML, Hess, FD, Bressan, RA, y Hasegawa, PM. (1989). Mechanisms of adaptation to salinity in cultured glycophyte cells. In J.H. Cherry (Eds.), *Biochemical and Physiological Mechanisms Associated with Environmental Stress Tolerance* pp. 139-157 Berlin: Springer-Verlag.

Blaha 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 in Enzymology* **317**: 292–309.

Blits, KC Gallagher, JL. (1990). Salinity tolerance of *Kosteletzkya virginica*: I. Shoot growth, ion and water relations. *Plant Cell Environ.* **13**, 409-418.

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

Blumwald, E y Poole, RJ. (1985) Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **78**, 163–167.

- Blumwald E y Poole R.** (1987) Salt tolerance in suspension culture of sugar beet. Induction of Na⁺/H⁺ antiport activity at the tonoplast by growth in salt. *Plant Physiol*; 83: 884-887
- Bolarin MC, Estan MT, Caro M et al.** (2001). Relationship between tomato fruit growth and fruit osmótica potencial under salinity. *Plant Science* **160**: 1153-1159
- 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
- Bowers K, Boaz PL, Patel FI, Stevens TH.** (2000) The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*; 11: 4277-4294.
- 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**, pp 1552-1560
- Brett CL, Donowitz M, Rao R.** (2005a) Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C223-C239.
- Brett CL, Tukaye DN, Mukherjee S, Rao R.** (2005b) The yeast endosomal Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell*; 16: 1396-1405.
- Brini F, Gaxiola RA, Berkowitz GA, Masmoudi K.** (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 Na⁺/H⁺ antiporter TNHx1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J Exp Bot*; 58: 301-308.
- Bucher, M, Schroeer, B, Willmitzer, L, and Riesmeier, JW.** (1997) Two genes encoding extension-like proteins are predominantly expressed in tomato root hair cells. *Plant Mol. Biol.* 35, 497–508
- Bustin SA, Nolan T** (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech.* 15; 155-66 Review.
- Byrt CS, Platten JD, Spielmeier W, James RA, Lagudah ES, et al.** 2007. HKT1;5-like cation transporters linked to Na⁺ exclusion loci in wheat, *Nax2* and *Kna1*. *Plant Physiol.* 143:1918–28
- Cagnac O, Leterrier M, Yeager M, Blumwald E,** (2007) Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H⁺ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*; 282: 24284-24293.
- Campbell, SA y 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⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis. *Plant J* 39: 834–846
- Chauhan S, Forsthoefel N, Ran Y, Quigley F, Nelson DE and Bohnert HJ.** (2000) Na⁺/myo-inositol symporters and Na⁺/H⁺-antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J*; 24: 511-522.
- Chen LH, Zhang B, Xu ZQ.** (2008) Salt tolerance conferred by overexpression of *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Transgenic Res*; 17: 121-132.

- Chen, S, Li, J, Wang, S, Fritz, E, Huttermann, A, Altman A.** (2003) Effects of NaCl on shoot growth, transpiration, ion compartmentation, and transport in regenerated plants of *Populus euphratica* and *Populus tomentosa*. *Can. J. For. Res.* 33, 967–975.
- Cheng, NH, Pittman, JK, Shigaki, T, Hirschi, KD.** (2002). Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H⁺/cation antiporter. *Plant Physiol.* **128**, 1245-1254.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK.** 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* **45**: 437–448
- Churchill KA, Holaway B, Sze H.** (1983) Separation of two types of electrogenic H⁺-pumping ATPases from oat roots. *Plant Physiol*; **73**: 921-928.
- Clerc S, Barenholz Y.** (1998) A quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe. *Anal Biochem*; **259**: 104-111.
- Clough SJ and Bent AF.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**:735-43.
- Colmer TD, Epstein E, Dvořák J.** 1995. Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt-sensitive wheat and a salt-tolerant wheat x *Lophopyrum elongatum* (Host) A. Löve amphiploid. *Plant Physiology* **108**: 1715–1724
- Cormack, BP, Valdivia, RH, Falkow, S,** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–38.
- Costa J.** (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**(5):299-305.
- Cramer GR.** 2002. Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. *Funct. Plant Biol.* **29**:561–67

- Cramer GR, Alberico GJ, Schmidt C.** 1994. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**: 675–692.
- Crawford, RMM.** (1989). *Studies in plant survival*. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne: Blackwell Scientific Publications.
- Cuartero J, Bolarin MC, Asins MJ et al.** (2006) Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of experimental botany*. **57**. 1045-1058.
- Cuartero, J; Yeo, AR, Flowers, TJ.** 1992. Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *The New Phytologist*, **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**:657–61
- 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
- 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⁺/H⁺ exchangers. *Biochemistry Journal* **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**:807–18
- Davenport, RJ, Muñoz-Mayor, A, Jha, D, Essah, PA, Rus, A, Tester, M.** (2007) The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Env.* **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 Regul.* **24**:285–95

- 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. *The New Phytologist* 175: 387-404
- Dracup, MNH, Greenway H.** (1985). A procedure for isolating vacuoles from leaves of the halophyte *Suaeda maritima*. *Plant Cell Environ.* 8, 149-154.
- Dschida, DJ, Platt-Aloia, KA, Thomson, WW.** (1992). Epidermal peels of *Avicennia germinans* (L.) Stearn: a useful system to study the function of salt glands. *Ann. Bot.* 70, 501-509.
- Dubcovsky J, Santa Maria G, Epstein E, Luo M-C, Dvořák J.** 1996. Mapping of the K^+/Na^+ discrimination locus *Kna1* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 448–454
- Ellul P; Garcia-Sogo B; Pineda B; Ríos G; Roig L A; 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. *Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* ;106:231-8.
- Epstein E, Rains DW, Elzam OE.** (1963) Resolution of dual mechanisms of potassium of absorption by barley roots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 49:684–692.
- Essah, P.A., Davenport, R.J. and Tester, M.** (2003) Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 307–318.
- Felsenstein J.** 1985 Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*; 39:783-791

- 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, T.J.** (2004). Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* **55**, pp. 307-319.
- Flowers TJ, Hajibagheri MA.** 2001. Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. *Plant and Soil* **231**: 1–9
- Flowers, T.J., Troke, P.F. y Yeo, A.R.** (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol*, **28**, pp. 89-121.
- Flowers TJ, Yeo AR.** 1986. Ion relations of plants under drought and salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 75–91.
- Flowers TJ, Yeo AR.** 1988. Ion relations of salt tolerance. In: Baker D, Halls J, eds. *Solute transport in plant cells and tissues*. Harlow: Longman, 392–416.
- Flowers, T.J. Yeo, A.R.** (1992). *Solute Transport in Plants*. Glasgow, Scotland: Blackie. 176 pp.
- Fortmeier, R. and Schubert, S.** (1995). Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion. *Plant Cell Environ.* **18**, 1041-1047.
- Foyer CH, Noctor G** (2005). Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**, 1866-75
- 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**:1115–23
- Fricke W, Akhiyarova G, Wei W, Alexandersson E, Miller A, et al.** 2006. The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *J. Exp. Bot.* **57**:1079–95

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⁺ transporter from Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 63–73

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

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⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ 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⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol*; 45: 146-159.

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

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. (1968).Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. *Exp Cell Res* 50:151.158

Garbarino J, Dupont FM.(1989) Rapid induction of Na⁺/H⁺ exchange activity in barley root tonoplast. *Plant Physiol*; 89: 1-4.

Garcia 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 and Environment* **20**: 1167–1174.

Garciadeblas, B., Senn, M.E., Banuelos, M.A. and Rodriguez-Navarro, A. (2003) Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* **34**, 788–801.

Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grifasi P, Alpier SL, Fink GR. (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* ; **96**: 1480-1485.

Glenn, E.P., Brown, J.J. y Blumwald, E. (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, pp 227-255

Gobert, A., Park, G., Amtmann, A., Sanders, D. and Maathuis, F.J.M. (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.

Gorham, J. (1990). Salt tolerance in *Triticeae*: K/Na discrimination in synthetic hexaploid wheats. *J. Exp. Bot.* **41**, pp 623-627.

Gouia, H., Ghorbal, H.G. and Touraine B. (1994). Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO₃⁻ reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant Physiol.* **105**, 1409-1418.

Greenway H. (1962) Plant response to saline substrates. I. Growth and ion uptake of several varieties of *Hordeum* during and after sodium chloride treatment. *Australian Journal of Biological Sciences* **15**: pp16–38.

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

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450)

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

Hager A, Frenzel R, Laible D. (1980) ATP-dependent proton transport into vesicles of microsomal membranes of *Zea mays* coleoptiles. *Z Naturforsch*; **35**: 783-793.

Hahnenberger KM, Jia Z, Young PG. (1996) Functional expression of the *Schizosaccharomyces pombe* Na⁺/H⁺ antiporter gene, *sod2*, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*; **93**: 5031-5036

Hajibagheri, M.A., Hall, J.L. and Flowers, T.J. (1984). Stereological analysis of leaf cell of the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum. *J. Exp. Bot.* **35**, 1547-1557

Hall, D., Evans, A.R., Newbury, J.J. and 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⁺/H⁺ 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, M. A., Quintero, F. J., Rubio, F. and Rodríguez-Navarro, A. (1993). Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol. Plant.* **89**, 868-874.

Haro R, Bañuelos MA, Senn MAE, Barrero-Gil J, Rodríguez-Navarro A. 2005. HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol.* 139:1495–506

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 463-499.

Hassidim M, Braun Y, Lerner HR, Reinhold L. (1990) Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ antiport in root membrane vesicles isolated from the halophyte *Atriplex* and the glycophyte cotton. *Plant Physiol* 1990; 94: 1795-1801.

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.

Higinbotham, N. (1973) Electropotentials of plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **24**, 25–46.

Hoagland D.R., Arnon DI, 1950: The water culture method for growing plant without soil. *California Agric. Expt. Stn. Bull.*, **47**.

Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, et al. 2007. Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBOJ.* 26:300–14

Horie, T. y Schroeder, J.I. (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. and Shinmyo, A.** (2001) Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* 27, 129–138.
- Huang, J., Hirji, R., Adam, L., Rozwadowski, K.L., Hammerlindl, J.K., Keller, W.A., et al.** (2000). Genetic engineering of glycine betaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* 122, 747-756
- Inoue, H, Nojima H, y Okayama H** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Gene* 96: 23-28.
- 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* 12:1667–77
- Jacoby, B.** (1979). Sodium recirculation and loss from *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Bot.* 43, 741-744.
- Jacoby, B.** (1994). Mechanisms involved in salt tolerance of plants. In M. Pessaraki (Eds.), *Handbook of Plant and Crop Stress* (pp. 97-123). New York: Marcel Dekker.
- Jeschke, W.D.** (1972). Wirkung von K⁺ auf die Fluxe und den Transport von Na⁺ in Gerstenwurzeln, K⁺-stimulierter Na⁺ -efflux in der Wurzelrinde. *Planta* 106, 73-90.
- Jeschke WD, Hartung W.** 2000. Root–shoot interaction in mineral nutrition. *Plant and Soil* 226, 57–69
- Kader, M.A., Seidel, T., Gollack, D. and Lindberg, S.** (2006) Expressions of OsHKT1, OsHKT2 and OsVHA are differently regulated under NaCl stress in salt-sensitive 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⁺/H⁺ antiporter gene of *Rosa hybrida*. *Genes Genet Syst*; 80: 121-128

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

Karimi, M., De Meyer, B. and Hilson, P. Modular cloning and expression of tagged fluorescent protein in plant cells. *Trends Plant Sci.* 2005 March;10(3): 103-105

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**:267–78

Kikkert JR, Vidal JR, Reisch BI (1993)Stable Transformation of Plant Cells by Particle Bombardment/Biolistics. *Methods in Molecular Biology*, vol. 286: Transgenic Plants: Methods and Protocols 61-78

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**:1067–78

Laemmi, UK. 1970 Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Landau M, Herz K, Padan E, Ben-Tal N.(2007) Model structure of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1). Functional and clinical implications. *J Biol Chem*; 282: 37854-37863.

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.* 32:139–49

- Lazof, D.B. Bernstein, N.** (1999). The NaCl induced inhibition of shoot growth: the case for disturbed nutrition with special consideration of calcium. *Adv. Bot. Res.* **29**, 113-189.
- Leidi EO, Barragán V, Cubero B, Quintero FJ, Pardo JM.** (2005) Function of endosomal NHX antiporters on plant K nutrition. Society of Experimental Biology Annual Main Meeting. Comparative Biochemistry and Physiology – Part A ; 141: S342.
- Leng, Q., Mercier, R.W., Hua, B.-G., Fromm, H. and Berkowitz, G.A.** (2002) Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol.* **128**, 400–410.
- Leshem Y, Melamed-Book N, Cagnac O, Ronen G, Nishri Y, Solomon M, Cohen G, Levine A.**(2006) Suppression of Arabidopsis vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂ containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*; **103**: 18008-18013.
- 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**:637-41
- Li JY, He XW, Xu L, Zhou J, Wu P, Shou HX, Zhang FC.**(2007) Molecular and functional comparisons of the vacuolar Na⁺/H⁺ exchangers originated from glycophytic and halophytic species. *J Zhejiang Univ SCIENCE B*; **9**: 132-140.
- Li WY, Wong FL, Tsai SN, Phang TH, Shao G, Lam HM.** (2006) Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. *Plant Cell Environ*; **29**: 1122-1137.
- Lin PJC, Williams WP, Luu Y, Molday RS, Orlowski J, Numata M.** (2005) Secretory carrier membrane proteins interact and regulate trafficking of the organellar (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger NHE7. *J Cell Science*; **118**: 1885-1897.

Lin PJC, Williams WP, Kobiljski J, Numata M. (2007) Caveolins bind to (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchanger NHE7 by a novel binding module. *Cell Signal*; 19: 978-988.

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⁺/H⁺ antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage root. *Plant Cell Environ* ; 31: 1325-1334

Liu J, Zhu J-K. 1997. An *Arabidopsis* mutant with increased calcium requirement for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 14960–14964

Liu, J.P., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S. and 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.

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

Lohaus, G., Hussmann, M., Pennewiss, K., Schneider, H., Zhu, J.J. and Sattelmacher, B. (2000). Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by a salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J. Exp. Bot.* **51**, 1721-1732.

Maathuis, F. Amtmann, A. (1999). K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ 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, Sanders D. 2001. Sodium uptake in *Arabidopsis thaliana* is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiology* **127**: 1617–1625

MacRobbie EAC.(1998) Signal transduction and ion channels in guard cells. *Phil Trans R Soc Lond B*; 353: 1475-1488.

Maresova L, Sychrova H. (2005) Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants. *Mol Microbiol.* 55:588-600.

Maresova L, Sychrova H (2006) *Arabidopsis thaliana* CHX17 gene complements the kha1 deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23(16):1167-71

Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathana, R., Horie, T., Fairbairn, D.J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimurae, M., Uozumi, N., Robertson, W., Sussman, M.R. and Schroeder, J.I. (2002) Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Lett.* 531, 157–161.

Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., Ward J.M., Hirschi K., Sze H., y col (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 1646-1667-

Matoh T, Ishikawa T, Takahashi E. (1988) Collapse of ATP-induced pH gradient by sodium ions in microsomal membrane vesicles prepared from *Atriplex gmelini* leaves. *Plant Physiol*; 89: 180-183

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

Mazel A, Leshem Y, Tiwari BS, Levine A.(2004) Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol*; 134: 118-128.

Moore CA, Bowden HC, Scrase-Field S, Knight MR, White PJ. 2002. The deposition of suberin lamellae determines the magnitude of cytosolic Ca²⁺ elevations in root endodermal cells subjected to cooling. *Plant J.* **30**:457–65

Mukherjee S, Kallay L, Brett CL, Rao R.(2006) Mutational analysis of the intramembranous H10 loop of yeast Nhx1 reveals a critical role in ion homeostasis and vesicle trafficking. *Biochem J*; 398: 97-105.

Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* **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**, pp. 645–63

Munns, R., Fisher, D.B. Tonnet, M.L. (1986). Na⁺ and Cl⁻ transport in the phloem from leaves of NaCl-treated barley. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**, 757-766.

Munns, R., Greenway, H. y Kirst, G.O. (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. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 949–957

Munns R, Hare RA, James RA, Rebetzke GJ. 2000b. Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **51**: 69–74.

Munns, R., Husain, S., Rivelli, A.R., James, R.A., Condon, A.G., Lindsay, M.P., et al. (2002). Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant Soil.* **247**, 93-105.

Munns, R. James, R.A. (2003). Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant Soil.* **253**, 201-218.

Munns, R. y Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, pp. 651-81

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**(3): 473-497.

Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, Kanazawa H.(2005) Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem* ; **280**: 1561-1572.

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

Nelson BK, Cai X, Nebenführ A. (2007). A multi-color set of in vivo organelle markers for colocalization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant Journal* **51**:1126-1136

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.

Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Pardo J.M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* **109**, 735-742.

Nuccio, M. L., Rhodes, D., McNeil, S. D. and Hanson, A. D. (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 128-134.

Nuez, F. 1995. "Nuez, F. (ed.). El cultivo del tomate". Mundi-Prensa, Madrid.

Numata M, Orłowski J. (2001) Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem*; **276**: 17387-17394.

Ohgaki R, Fukura N, Matsushita M, Mitsui K, Kanazawa H. (2008) Cell surface levels of organellar Na⁺/H⁺ exchanger isoform 6 are regulated by interaction with RACK1. *J Biol Chem*; 283: 4417-4429.

Ohnishi M, Fukada-Tanaka S, Hoshino A, Takada J, Inagaki Y, Iida S. (2005) Characterization of a novel Na⁺/H⁺ 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, Hayashi Y, Nakashima A, Hamada A, Tanaka A, Nakamura T, Hayakawa T. (2002) Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett*; 532: 279-282.

Olias R, Eljakaoui Z, Li J, de Morales PA, Marín-Manzano MC, Pardo JM, Belver A. (2009) 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 and Environment* 32, 904–916

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⁺/H⁺ antiporter family of plant origin. *Plant Mol Biol.*;58(1):75-88.

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

Palmgren MG. (1991) Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. *Anal Biochem*; 192: 316-321.

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.

- Paris S, Pouysségur J.** (1983) Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na^+/H^+ antiport in chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem*; 258: 3503-3508.
- Parks, G.E., Dietrich, M.A. and Schumaker, K.S.** (2002). Increased vacuolar Na^+/H^+ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* **53**, 1055-1065.
- 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**:941–48
- Paul MJ, Foyer CH.** 2001. Sink regulation of photosynthesis. *J. Exp. Bot.* **52**:1383–400
- Pennewiss, K., Mühling, K.H., and Sattelmacher, B.** (1997). Leaching from the leaf surface and its significance for apoplastic ion balance. In T. Ando et al. (Eds.), *Plant nutrition – for Sustainable Food Production and environment* (pp. 87-88). Japan: Kluwer Academic Publishers.
- Perez-Alfocea, F., Balibrea, M.E., Alarcon, J.J., and Bolarin, M.C.** (2000). Composition of xylem and phloem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *J. Plant Physiol.* **156**, 367-374.
- Pessaraki, M. y Szabolcs, I.** (1994). Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. En M. Pessaraki (Eds.), *Handbook of Plant and Crop Stress*. pp. 1-15 New York: Marcel Dekker
- Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J., Horie, T., Leigh, R.A., Lin, H.-X., Luan, S., Maser, P., Pantoja, O., Rodriguez-Navarro, A., Schachtman, A.-A., Schroeder, J.I., Sentenac, H., Uozumi, N., nor Very, A.-A., Zhu, J.-K., Dennis, E.S. and Tester, M.** (2006) Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* **11**, 372–374.

- 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.
- Pulakat L, Cooper S, Knowle D, Mandavia C, Bruhl S, Hetrick M, Gavini N.**(2005) Ligand-dependent complex formation between the angiotensin II receptor subtype AT2 and Na⁺/H⁺ exchanger NHE6 in mammalian cells. *Peptides*; 26: 863-873.
- Qiu, Q.S., Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Zhu, J.K. and Schumaker, K.S.** (2003) Na⁺/H⁺ 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⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:8436–41
- Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK.** (2004) Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly sensitive (SOS) pathway. *J Biol Chem*; 279: 207-215
- Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM.** 2000 Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Lett* ; 471: 224-228.
- Quintero FJ, Ohta M, Shi HZ, Zhu J-K, Pardo JM.** 2002. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:9061–66

- Rajagopal D, Agarwal P, Tyagi W, Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK.** (2007) Pennisetum glaucum Na⁺/H⁺ 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.
- Reddy T, Ding J, Li X, Sykes BD, Rainey JK, Fliegel L.** (2008) Structural and functional characterization of TM IX of the NHE1 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem*; 283: 22018-22030.
- 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
- Rhodes D, Hanson AD**,1993. Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, **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.
- Rilke, S. y Reimann, C.** (1996). Morphological and ecophysiological differences between the subspecies of *Salsola kali* L. in Europe: results of culture experiments. *Flora* **191**, 363-376.
- Rodríguez-Navarro y Ramos J** 1984 Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **159**: 940-945
- Rodríguez-Rosales MP, Jiang XJ, Gálvez FJ, Aranda MN, Cubero B, Venema K.** (2008) Overexpression of the tomato K⁺/H⁺ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytol*; 179: 366-377

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

Rossignol, M., P. Thomas, and C. Grignon. 1982. Proton permeability of liposomes from natural phospholipid mixtures. *Biochim. Biophys. Acta.* 684:195-199.

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

Rubio F, Santa-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., Lee, B., Muñoz-Mayor, A., Sharkuu, A., Miura, K., Zhu, J.K., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (2004) AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in plants. *Plant Physiol.* 136, 2500–2511.

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

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

Saitou N, Nei M.(1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* ; 4:406–25].

Sakano K.(1998) Revision of biochemical pH-Stat: Involvement of alternative pathway metabolisms. *Plant Cell Physiol*; 39: 467-473.

- Santa-Cruz A, Acosta M, Rus A, Bolarin MC.** 1999. Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 65–71
- Santa-Maria GE, Rubio F, Dubcovsky J, Rodriguez-Navarro A.**(1997) The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* **9**:2281-9
- Sato Y, Sakaguchi M.** (2005) Topogenic properties of transmembrane segments of *Arabidopsis thaliana* NHX1 reveal a common topology model of the Na⁺/H⁺ exchanger family. *J Biochem* ; **138**: 425-431.
- Scarborough GA.** (1980) Proton translocation catalyzed by the electrogenic ATPase in the plasma membrane of *Neurospora*. *Biochemistry*; **19**: 2925-2931
- Schachtman, D.P., Kumar, R., Schroeder, J.I. and Marsh, E.L.**(1997) Molecular and functional characterization of a novel lowaffinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11079–11084.
- Schachtman DP, Lagudah ES, Munns R.** 1992. The expression of salt tolerance from *Triticum tauschii* in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **84**: pp 714–719.
- Schachtman DP, Schroeder JI.** 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher-plants. *Nature* **370**:655–58
- Scherer GFE, Martiny-Baron G.**(1985) K⁺/H⁺ exchange transport in plant membrane vesicles is evidence for K⁺ transport. *Plant Sci* ; **41**: 161-168.
- Serrano, R.** (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms. Toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol.* **165** pp 1-52

- Shabala, L., Cuin, T.A., Newman, I.A. and Shabala, S.** (2005) Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis* sos mutants. *Planta* 222, 1041–1050.
- Shabala, S. y Cuin, T.A.** (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 133, pp. 651-669
- Shahin EA** (1985) Totipotency of tomato protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 69: 235–240
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu J-K.** 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 6896–6901.
- Shi, H., Lee, B.-H., Wu, S.-J. and Zhu, J.K.** (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ 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⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* 2002; 50: 543-550.
- Shi HZ, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu J-K.** 2002a. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long-distance Na⁺ 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, J. K., Rus, A., Hasegawa, P. M., and 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
- Smekens, M.J. y Vantienderen, P.H.** (2001). Genetic variation and plasticity of *Plantago coronopus* under saline conditions. *Acta Oecologica – Int. J. Ecol.* **22**, 187-200.
- Song C, Guo Y, Qiu Q, Lambert G, Galbraith DW, Jagendorf A, Zhu JK.** A probable Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* (2004) **101**:10211–10216
- Sottosanto JB, Gelli A, Blumwald E.** (2004) DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J*; 40: 752-771.
- Staal M, Maathuis FJM, Elzenga JTM, Overbeek JHM, Prins HBA.**(1991) Na⁺/H⁺ 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.
- Strogonov, B.P.** (1964). *Physiological Basis of Salt Tolerance in Plants*. New York: Academy of Science USSR and Davey and Co
- Strogonov, B.P.** (1973). *Metabolizm rastenij v uslovijah zasolenija* (Metabolism of plants under salinity conditions). Moskva: Izdatelstvo Nauka.
- Su H, Gollmack D, Zhao CS, Bohnert HJ** (2002) The expression of HAK-type K⁺ transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiol* **129**: 1482–1493

Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W.Y., Leung, H.Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J.I. and Uozumi, N. (2005) Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter induced Na unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* 44, 928–938.

Szabolcs, I. (1989). *Salt-affected soils*, Boca Raton: CRC Press

Sze H.(1983) Proton-pumping adenosine triphosphatase in membrane vesicles of tobacco callus. Sensitivity to vanadate and K⁺. *Biochim Biophys Acta*; 732: 586-594.

Sze H., Padmanaban S., Cellier F., Honys D., Cheng N.H., Bock K.W., Conejero G., Li X., Twell D., Ward J.M. y Hirschi K.D. (2004). Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K⁺ homeostasis in pollen development. *Plant Physiol.*136: 2532-47

Taglicht D, Padan E, Schuldiner S. (1991) Overproduction and purification of a functional Na⁺/H⁺ antiporter coded by nhaA (ant) from Escherichia coli. *J Biol Chem*; 266: 11289-11294

Tal M. 1971. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* and *L. esculentum minor* to sodium chloride solution. *Australian Journal of Agricultural Research* 24: 353–361

Talke, I.N., Blaudez, D., Maathuis, F.J.M. and Sanders, D. (2003) CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signaling? *Trends Plant Sci.* 8, 286–293.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.

- Termaat A, Passioura JB, Munns R.** 1985. Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl-affected wheat and barley. *Plant Physiol.* 77:869–72
- Tester M. y Davenport R.** (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* **91**, pp 503-527
- 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(9):4350-4.
- Tracy FE, Gilliam M, Dodd AN, Webb AAR, Tester M.** 2008. Cytosolic free Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environl.* **31**:1063-73.
- Trejo CL, Davies WJ, Ruiz L.** (1993). Sensitivity of stomata to Abscisic Acid (An effect of the mesophyll). *Plant Physiol.* 102(2):497-502
- Tukey, H.B.** (1970). The leaching of substances from plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**, 305-324.
- Tuteja N.** (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology: Osmosensing and Osmosignaling*, **428**, pp. 419-438
- Ungar, I.A.** (1991). *Ecophysiology of Vascular Halophytes*. Boca Raton: CRC Press.
- Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S. Tsuboi, A., et al.** (2000). The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* **122**, 1249-1259.
- Vallejo AJ, Peralta ML, Santa-María GE** (2005) Expression of potassium-transporter coding genes, and kinetics of rubidium uptake, along a longitudinal root axis. *Plant Cell Environ* 28: 850–862

Vasekina AV, Yershov PV, Reshetova OS, Tikhonova TV, Lunin VG, Trofimova MS, Babakov AV. (2005) Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from Barley: identification and response to salt stress. *Biochemistry (Mosc)*; 70: 100-107.

Vaucheret H., Béclin C., Fagard M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* 114 :3083-3091.

Venema K, Belver A, Marín-Manzano MC, Rodríguez-Rosales MP, Donaire JP. (2003) A novel intracellular K⁺/H⁺ antiporter related to Na⁺/H⁺ antiporters is important for K⁺ ion homeostasis in plants. *J Biol Chem* ; 278: 22453-22459.

Venema K, Quintero FJ, Pardo JM, Donaire JP. (2002) The Arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem*; 277: 2413-2418.

Vera-Estrella R, Barkla BJ, García-Ramírez L, Pantoja O. (2005) Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na⁺ 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⁺/H⁺ antiporter from *Pennisetum glaucum* for enhancing salinity tolerance in rice. *J Biosci*; 32: 621-628.

Viehweger K, Dordschbal B, Roos W. (2002) Elicitor-activated phospholipase A₂ generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for pH signalling via the activation of Na⁺-dependent proton fluxes. *Plant Cell*; 14: 1509-1525

Villalta I; Reina-Sanchez A; Bolarin MC et al (2008) Genetic analysis of Na⁺ and K⁺ 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.

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

Wakabayashi S, Pang T, Su X, Shigekawa M.(2000) A novel topological model of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *J Biol Chem*; 275: 7942-7949

Walker, D. J., Leigh, R. A., Miller, A. J. (1996) Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10510–10514

Wallis J., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. and Rothstein, R. (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, 58:, 409–419.

Watson JM., Fusaro AF., Wang MB., Waterhouse PM. (2005). RNA silencing platforms in plants. *FEBS Letters* 579:5982-5987.

Wells KM, Rao R.(2001) The yeast Na⁺/H⁺ exchanger Nhx1 is an N-linked glycoprotein. Topological implications. *J Biol Chem*; 276: 3401-3407.

Wesley SV., Helliwell CA., Smith NA., Wang MB., Rouse DT., Liu Q., Gooding PS., Singh SP.,, Abbott D., Stoutjesdijk PA., Robinson SP., Gleave AP., Green AG., Waterhouse PM. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27(6):581-590.

Wild A. 1988. *Russell's soil conditions and plant growth. 11th edn.* Harlow: Longman.

- 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
- Winter, E.** (1982). Salt tolerance of *Trifolium alexandrinum* L. III. Effects of salt on ultra-structure of phloem and xylem transfer cells in petioles and leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**, 239-250.
- Wu CA, Yang GD, Meng QW, Zheng CC.** (2004)The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol*; **45**: 600-607.
- Wu, S.J., Ding, L. and Zhu, J.K.** (1996) SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* **8**, 617–627.
- 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, New York, 1983, pp. 528-562.
- Xia T, Apse MP, Aharon GS, Blumwald E.** (2002) Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiol Plant* ; **116**: 206-212
- Xiong, L. Zhu, J.-K.** (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* **25**, 131-139.
- 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⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Sci.* **167**:849–59

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⁺/H⁺ 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⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺- and pH- dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 16107-16112.

Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N. (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.

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

Yeo, A.R. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J.Exp. Bot.* **49**, pp 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.* 42:881–89

- Yeo AR, Yeo ME, Flowers TJ.** 1987. The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *Journal of Experimental Botany* **38**: 1141–1153
- Yokoi, S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M.** (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.** 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ 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⁺(K⁺)/H⁺ 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 intertexta* and *Melilotus indicus* plants. *Physiol Plant* 2007; **131**: 122-130.
- Zhang GH, Su Q, An LJ, Wu S.** 2008. Characterization and expression of a vacuolar Na⁺/H⁺ 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 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⁺ transporter. *Plant Physiol.* **148**: 796-807
- 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⁺/H⁺ antiporter gene from *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*; **164**: 1377-1383
- 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
- Ziegler H, Lüttge U.** 1967. Die Salzdrüsen von *Limonium vulgare*. II. Mitteilung: Die Lokalisierung des Chlorids. *Planta.* **74**, 1-17.
- Zörb C, Noll A, Karl S, Leib K, Yan F, Schubert S.** 2004. Molecular characterization of Na⁺/H⁺ antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. *J Plant Physiol* ; **162**: 55-66.
- Zuckerkindl E, Pauling L.** 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins, *Evolving Genes and Proteins*, edited by V. Bryson and H.J. Vogel. Academic Press, New York. pp. 97-166

Conclusiones

Conclusiones

- 1.- Se han identificado dos nuevos antiportadores NHX de tomate, comprobándose que ambos complementan la sensibilidad a higromicina y NaCl de mutantes de levaduras con una disrupción en ScNHX1
- 2.- Los antiportadores LeNHX2 y 4 muestran actividad de antiporte K^+/H^+ y Na^+/H^+ . La afinidad para Na y K de LeNHX4 es similar a la observada para AtNHX1, por lo que podría tener una función similar.
- 3.-LeNHX4 tiene una localización similar a AtNHX1 y 2 en tonoplasto; mientras que LeNHX3 parece estar localizado en Golgi y LeNHX2 se expresa en pequeñas vesículas alrededor de las vacuolas.
- 4.- LeNHX2 confiere tolerancia a la salinidad cuando se expresa en Arabidopsis. Las plantas de tomate que expresan construcciones para el silenciamiento de LeNHX2 muestran alteraciones en el desarrollo, en la producción de frutos y semillas y son sensibles al estrés salino.

Anexo I

Secuencias de los antiportadores LeNHX3 y LeNHX4

LeNHX3

El gen LeNHX3 se identifico por *Nested PCR* utilizando la genoteca de pelos radiculares como descrito en Material y Metodos. Los Cebadores utilizados fueron:

Clonación de la parte 5`:

Koli 86: TCCCA**T**TTTCAAGGT**G**CCCAA

Koli 88: TGATATCAAGGTGCCAACTGC

Clonación de la parte 3`:

Koli 85 TGACGGGCAATTTTGATCGGA

Koli 87 GTCCATTACTGCCCTTGTTAT

Cebadores anidados del vector Bluescript:

Bluescript-R : 5-ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG

Bluescript-F : 5-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG

Bluescript-R3: 5-CCG CTC T AG AAC TAG TGG ATC

Bluescript-F2: 5-CTA TAG GGC GAA TTG GGT ACC

Las secuencias de los cebadores estan basadas en las secuencias de los ESTs. En algunos casos esta secuencia no coresponde a la secuencia final obtenido, debido a errores en las secuencias publicadas de los ESTs. Estos bases estan indicado en rojo en los cebadores (Koli 86).

Los fragmentos obtenidos por los PCR utilizando los pares de cebadores 85-R y 87-R3 asi como F-86 y F2-88 se clonaron en el vector pSTBlue-1 y se secuenciaron los insertos como descrito en Material y Metodos, para

determinar la secuencia completa del gen. Finalmente se amplificó el gen completo de la genoteca con cebadores específicos y se clonó el producto en pENTR-D/TOPO.

Secuencia vector genoteca EcoRI

TTCCCTTTCACCTTTGATTCTCAATTTTAAATTTTCAATTATTTCTTACTGAATTCGCTTTTGTTCGAAGTTTGGATGATT
←-----

GTGTTTCAGTTTCGAGTAGTTTGAGTTATTTTGCTAAAAATCTTGAGATCTGATTGAATTTCCGGTGTGTAAACTCAATT

Nested PCR Koli 85 ->
TTGACGGGCAATTTTGATCGGAATATTGGAGTTTGTGTTGAATTGAAATAAGGTTTCCAAAGAGGAAACTTGTTCGAAAAT

Codon de iniciación

1 ATG GTG TTT GAC TTT GGG ACG CTG GTG GCA AGT TTG AAC AGA TTA
 45
 1 M V F D F G T L V A S L N R L
 15

46 TCA ACT TCT GAT CAT CAA TCT GTT GTG TCG ATT AAC TTG TTT GTT
 90
 16 S T S D H Q S V V S I N L F V
 30

91 GCA TTA ATC TGC GCG TGT ATT ATT ATC GGT CAT CTA CTC GAG GAA
 135
 31 A L I C A C I I I G H L L E E
 45

-----*EST554564*-----

Nested PCR Koli 87 ->

136 AAT AGA TGG ATG AAT GAG TCC ATT ACT GCC CTT GTT ATC GGT CTT
 180
 46 N R W M N E S I T A L V I G L
 60

181 TGC ACT GGA GTT GTC ATT CTA CTA ATA AGT GGA GGA AAG AAC TCA
 225
 61 C T G V V I L L I S G G K N S
 75

226 CAT ATT TTA GTC TTC AGC GAA GAT CTT TTC TTC ATT TAC CTT CTT
 270
 76 H I L V F S E D L F F I Y L L
 90

271 CCG CCT ATC ATT TTT AAT GCT GGG TTT CAG GTG AAA AAG AAA TCA
 315
 91 P P I I F N A G F Q V K K K S
 105

316 TTT TTC CGC AAT TTC AGC ACT ATC ATG CTT TTT GGG GCA GTT GGC <- Koli 88
 360
 106 F F R N F S T I M L F G A V G
 120

Nested PCR
 361 ACC TTG ATA TCA TTC ATT ATC ATA TCA TTC GGT GCT ACT AGC ATT
 405
 121 T L I S F I I I S F G A T S I
 135

<- Koli 86 Nested PCR
 406 TTC AAG AAA TGG AAT ATT GGG TAC CTT GAA ATT GGA G AT TAC CTT
 450
 136 F K K W N I G Y L E I G D Y L
 150

451 GCT ATT GGA GCA ATC TTC TCT GCA ACA GAT TCT GTT TGC ACC TTA
 495
 151 A I G A I F S A T D S V C T L
 165

496 CAA GTG CTT AGT CAG GAT GAA ACA CCC TTA CTA TAC AGT CTA GTT
 540
 166 Q V L S Q D E T P L L Y S L V
 180

541 TTT GGG GAA GGT GTT GTG AAT GAT GCC ACA TCT GTA GTT CTG TTC
 585
 181 F G E G V V N D A T S V V L F
 195

586 AAT GCT GTC CAG AAC TTT GAC TTA TCT CAT ATC AAC ACA AGC AAA
 630
 196 N A V Q N F D L S H I N T S K
 210
 328

631 GCT CTG GAA TTA GTT GGA AAT TTT CTG TAC TTG TTT GCG TCG AGC
 675
 211 A L E L V G N F L Y L F A S S
 225

676 ACC ATC TTA GGG GTT GTT GCT GGT CTA CTG AGC GCC TAT ATA ATT
 720
 226 T I L G V V A G L L S A Y I I
 240

721 AAA AAA CTC TAC TTT GGA AGG CAC TCT ACT GAC CGT GAG GTT GCT
 765
 241 K K L Y F G R H S T D R E V A
 255

766 ATA GTG ATA CTT ATG GCT TAC CTA TCT TAC ATG CTT GCT GAA TTA
 810
 256 I V I L M A Y L S Y M L A E L
 270

811 TTC TAT TTA AGT GCA ATC CTC ACT GTG TTT TTC TCT GGG ATC GTG
 855
 271 F Y L S A I L T V F F S G I V
 285

856 ATG TCT CAC TAC ACC TGG CAT AAT GTG ACT GAG AGC TCA AGA GTC
 900
 286 M S H Y T W H N V T E S S R V
 300

901 ACC ACC AAG CAC GCT TTT GCT ACA TTA TCA TTT ATT GCT GAA ATA
 945
 301 T T K H A F A T L S F I A E I
 315

946 TTC ATA TTC CTT TAT GTT GGT ATG GAT GCT TTG GAC ATT GAG AAG
 990
 316 F I F L Y V G M D A L D I E K
 330

991 TGG AGA TTT GTA AGC GAC AGC CCA CAA TTA TCA GTT CAA GTT AGC
 1035
 331 W R F V S D S P Q L S V Q V S
 345

1036 CCC ATA CTG TTG GGT CTT GTT TTG GTT GGA AGG GCA GCA TTT GTC
 1080
 346 P I L L G L V L V G R A A F V
 360

1081 TTC CCC CTG TCA TTT TTG TCC AAC TTG ATG AAG AAG TCT CCG GAG
1125
361 F P L S F L S N L M K K S P E
375

1126 GAG AGG ATT AGC TTT AAC CAG CAA ATC ATA ATA TGG TGG GCT GGA
1170
376 E R I S F N Q Q I I I W W A G
390

1171 CTT ATG CGA GGT GCT GTT TCA GTG GGT CTT GCT TAT AAT CAG TTT
1215
391 L M R G A V S V G L A Y N Q F
405

1216 ACC AGG GGA GGC CAT ACT CAG TTA CGT GCC AAT GCC ATA ATG ATC
1260
406 T R G G H T Q L R A N A I M I
420

1261 ACA AGT ACT ATC ACT GTT GTC CTT TTC AGC ACA GGG GTA TTC GGG
1305
421 T S T I T V V L F S T G V F G
435

1306 TTG ATG ACA AAA CCT TTA ATC AGA TTA TTG CAA CCC TCA CCA AAA
1350
436 L M T K P L I R L L Q P S P K
450

1351 CAC TTG ACC AGA ATG ATC TCT TCT GAA CCG ACG ACC CCA AAA TCC
1395
451 H L T R M I S S E P T T P K S
465

1396 TTC ATC GTG CCA CTT CTT GAA AGT ACA CAA GAC TCA GAA GCT GAT
1440
466 F I V P L L E S T Q D S E A D
480

1441 CTG GGC CCA AAT GTA CCC CGT CCC CAT AGT TTG CGT ATG CTC CTA
1485
481 L G P N V P R P H S L R M L L
495

1486 TCA ACA CCA TCT CAC ACT GTG CAT CGT TAC TGG AGA AAA TTT GAC
1530
496 S T P S H T V H R Y W R K F D
510

1531 AAC GCA TTC ATG CGT CCC GTT TTC GGT GGA CGA GGT TTT GTT CCT
 1575
 511 N A F M R P V F G G R G F V P
 525

1576 TTT GTT CCA GGA TCA CCA ACG GAA CCA AGT GGT CAT TAA 1614
 526 F V P G S P T E P S G H *

TTGCATTGCTGGATATGCAGATTACAGAAAATCATTTGTGTCTTGGG

(No se determinó por completo la secuencia 3-prime UTR del fragmento amplificado con los cebadores koli 87 y R3, ya que por alguna razón se trunco la lectura).

LeNHX4

El gen LeNHX4 se identifico por Race-5`y Race-3`a partir del EST 405060. La parte 5`tambien se identifico a partir del EST 553877 por Race-5` como descrito en Material y Metodos. Los Cebadores utilizados fueron:

Koli 102: 5-GGAGGGGTGTCTCATCCTGATGTAGG Race-5`

Koli 103: 5-TCACTCATGGGGGACACACTCAACTG Race-3`

Koli 104: 5-CCTTCAGAGTCCTCTCGACTGCCTAG Race-5`

Los fragmentos obtenidos por los Race se secuenciaron como descrito en Material y Metodos, para determinar la seccuencia completo del gen. Finalmente se amplifico el gen completo del cDNA con cebadores específicos y se clono el producto en pENTR-D/TOPO.

SECUENCIA:

5-prime UTR-TCTTCTCCATTTTGGGAGCAATTCACGACGAAAACCTCGAAGCAG
 ACAAAATATTTGAACTTTACTTTTGCACCTTTTCTCTTCCATTTTCTTTTTCTTTTTCTGGTTTC
 AGAAAGTTTTGAGGATTTGTAATATTTTTTCTGCTCTGTTTTGCGGCGCTTTCAGAATGCAATTA
 TATTGGTAAAAGGCGCTGGAAGCTTTTTTGTTCATTGAAGATTGACATGACCGGAGCTAATCG
 CAATGAAAACCTTGGTGAAGTTGAAACAAAGTTGGTGAACCTTGTATTACAAAGTGGCAAAGTG

Codon de iniciación

1 ATG GCT TCT GTG CTG GCT TCT CTG TTT CCA AAA CTG GGA TCT TTG
45
1 M A S V L A S L F P K L G S L
15

46 GGT ACT TCA GAT CAT GCT TCT GTT GCA TCT ATC AAC CTC TTT GTG
90
16 G T S D H A S V A S I N L F V
30

91 GCA CTC CTT TGT GCT TGC ATT ATC ATT GGT CAT CTC TTG GAG GAG
135
31 A L L C A C I I I G H L L E E
45

136 AAC CGC TGG GTT AAT GAG TCC ATT ACT GCC CTC ATA ATT GGT TTG
180
46 N R W V N E S I T A L I I G L
60

181 GGT ACA GGA GTG GTT ATC TTG CTT GTA AGT GGT GGA AAG AGC TCA
225
61 G T G V V I L L V S G G K S S
75

226 CAC CTT TTG GTT TTC AGT GAA GAT CTC TTT TTC ATA TAT CTA CTT
270
76 H L L V F S E D L F F I Y L L
90

271 CCT CCA ATC ATA TTT AAT GCA GGG TTC CAG GTA AAA AAG AAG CAA
315
91 P P I I F N A G F Q V K K K Q
105

316 TTT TTC GTG AAC TTC ATG ACT ATA ATG CTG TTC GGA GCC ATT GGT
360
106 F F V N F M T I M L F G A I G
120

361 ACC CTG GTC TCA TGT GCC ATT ATA TCA TTA GGT GCC ATT CAA ACT
405
121 T L V S C A I I S L G A I Q T
135

406 TTC AAG AAG TTG GAC ATT GAA TTC CTA GAT ATT GGG GAT TAT CTT
450
136 F K K L D I E F L D I G D Y L
150

←----- *EST553877* -----

451 GCA ATT GGA GCA ATA TTT GCT GCC ACA GAT TCC GTC TGC ACA TTG
 495
 151 A I G A I F A A T D S V C T L
 165

 Cebador reverso para Race-5` (Koli 102)
 496 CAG GTC CTA CAT CAG GAT GAG ACA CCC CTC CTT TAC AGT CTT GTA
 540
 166 Q V L H Q D E T P L L Y S L V
 180

 541 TTT GGA GAA GGA GTT GTA AAT GAT GCT ACA TCG GTG GTG CTT TTC
 585
 181 F G E G V V N D A T S V V L F
 195

 586 AAT GCT ATT CAA AAC GTT GAC CTT ACG AGC TTG AAT CCC AGT ATA
 630
 196 N A I Q N V D L T S L N P S I
 210

 631 GCC CTC AGT TTC CTT GGC AAC TTC TTC TAT CTG TTC CTT GCT AGC
 675
 211 A L S F L G N F F Y L F L A S
 225

 676 ACT TTA CTG GGA GCA GGA ACT GGT CTT CTT AGT GCT TAC ATT ATC
 720
 226 T L L G A G T G L L S A Y I I
 240

 721 AAG AAG CTG TAT TTT GGC AGG CAC TCC ACA GAT CGT GAG GTT GCC
 765
 241 K K L Y F G R H S T D R E V A
 255

 766 CTT ATG ATG CTC ATG GCT TAT TTA TCA TAC ATG CTG GCC GAA CTA
 810
 256 L M M L M A Y L S Y M L A E L
 270

 811 TTC TAT TTG AGT GGG ATT CTC ACC GTA TTT TTC TGT GGT ATT GTG
 855
 271 F Y L S G I L T V F F C G I V
 285

 856 ATG TCT CAT TAC ACT TGG CAC AAT GTG ACC GAG AGT TCA AGA GTC
 900
 286 M S H Y T W H N V T E S S R V
 300

901 ACT ACA AGG CAC ACT TTT GCA ACT TTG TCA TTT CTT GCA GAG ACT
 945
 301 T T R H T F A T L S F L A E T
 315

 946 TTC CTC TTC CTC TAT GTG GGC ATG GAT GCT TTG GAT ATC GAG AAG
 990
 316 F L F L Y V G M D A L D I E K
 330

 991 TGG AAA TTT GTT GGT GAC AGG CCT GGA TTA TCA ATT TCC GCG AGT
 1035
 331 W K F V G D R P G L S I S A S
 345

 1036 TCG ATA CTG ATG GGA CTA ATC TTG TCT GGG GAG AGC TGC TTT TGT
 1080
 346 S I L M G L I L S G E S C F C
 360

 1081 TTT TCC ATT ATC ATA CTT ATC CAA CTT AAT GAA GAA ATC CTC GGA
 1125
 361 F S I I I L I Q L N E E I L G
 375

 1126 AGA AAA AAT ACC TTT AGG CAG CAA GTG ATA ATA TGG TGG GCA GGT
 1170
 376 R K N T F R Q Q V I I W W A G
 390

 1171 TTG ATG AGA GGC GCA GTG TCC ATG GCA CTG GCA TAT AAT AAG TTC
 1215
 391 L M R G A V S M A L A Y N K F
 405

 Cebador Forward para race-3` (Koli 103)
 1216 ACT CAT GGG GGA CAC ACT CAA CTG CAG GAC AAT GCA ATA ATG ATT
 1260
 406 T H G G H T Q L Q D N A I M I
 420

 1261 ACC AGC ACG ATA ACC ATT GTT CTA TTC AGC ACA ATG GTA TTT GGT
 1305
 421 T S T I T I V L F S T M V F G
 435

 1306 CTA ATG ACA AAA CCC CTT ATA AGT CTC CTG CTG CCA CCA CAG AGG
 1350
 436 L M T K P L I S L L L P P Q R
 450

 334

```

1351 CAA TTG AGT ACA GTG TCA TCA GGT GCA AAT ACT CCT AAG TCT CTA
1395
451 Q L S T V S S G A N T P K S L
465
-----
Cebador reverso para race-5` (Koli 104)
1396 ACA GCC CCA CTC CTA GGC AGT CGA GAG GAC TCT GAA GGT GAT TTA
1440
466 T A P L L G S R E D S E G D L
480
-----
1441 AAT GTC CCA GAT CTT CCT CAC CCA CCA AGT TTG AGG ATG CTA CTT
1485
481 N V P D L P H P P S L R M L L
495
-----
1486 ACC GCA CCA AGT CAT AAA GTG CAT CGG TAC TGG CGC AAG TTT GAC
1530
496 T A P S H K V H R Y W R K F D
510
-----
1531 GAT GCA TTC ATG CGC CCT ATG TTT GGT GGT CGG GGA TTT GCT CCT
1575
511 D A F M R P M F G G R G F A P
525
-----
1576 CCT GCT CCT CGT TCT CCA ACG GAA CAC GGT CCA TGA 1611
526 P A P R S P T E H G P *

```

3-prime UTR

```

TG TGCACTAGAAAAATGAAATTGATGTAAAAAAGGAAGTCGCCAAGGGACGTCCAGGGAA
TCCTAAAAGATTCTGTGTACACAATTGCTGACAGCTTCACCAGCAAAATCCCCTCATTTC
AGTGGTGGATTTACGAAACGGTGAAGCTCTGGCTGACAACGGCGAGTATGTAAGTTAATC
CTGAAAAATGGCAATATCTCTATTCAAACCTATTGTAAATTTTGGCTGCTTAAATGTTGCC
ATCTTCTTTTTGCGTGGTGTGGTATTTATATATATATCCCATTTGTAATGTTTTATGAAGTT
GAGAAAGAAATAATTGTCATAGAGTCATTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

PolyA

Abreviaturas

Indice

Indice de figuras y Tablas	pag001
Introducción y Objetivos	pag 015
Antecedentes científicos	pag 019
1. Problemática de la salinidad en agricultura.....	pag 021
2. Tolerancia a la salinidad en plantas.....	pag 024
3. Efectos de la salinidad sobre las plantas.....	pag 028
4. Mecanismos de tolerancia a la salinidad.....	pag 033
4.1. Tolerancia al componente osmótico de la salinidad.....	pag 033
4.2. Tolerancia al componente iónico de la salinidad.....	pag 035
4.2.1. Limitación de la acumulación de Na ⁺ : Exclusión de Na ⁺	pag 036
4.2.2. Limitación de la acumulación de Na ⁺ : Retranslocación y distribución de los iones	pag 039
4.2.3. Limitación de la acumulación de Na ⁺ : Excreción de sal.....	pag 040
4.2.4. Acumulación de sales: Acumulación vacuolar.....	pag 041
4.2.5. Acumulación de sales: Suculencia.....	pag 041
5. Transportadores de Na ⁺	pag 042
5.1. Entrada tóxica de Na ⁺	pag 044
5.2. Adsorción de Na ⁺ y K ⁺ y redistribución en la planta.....	pag 046
5.3. Exclusión activa de Na ⁺	pag 051

5.4. Eflujo de Na ⁺ a nivel de la membrana plasmática.....	pag 053
5.5. Acumulación vacuolar de Na ⁺ y K ⁺	pag 060
6. Transportadores NHX.....	pag 062
6.1. Análisis filogenético.....	pag 062
6.2. Localización y expresión génica.....	pag 067
6.3. Propiedades bioquímicas.....	pag 070
6.3.1. Detección de antiportadores Cation/Protón en vesículas.....	pag 070
6.3.2. Primeras determinaciones bioquímicas de la actividad antiporte cation/protón en vesículas de membrana.....	pag 072
6.3.3. Medida de la actividad de las proteínas de la familia de antiportadores NHX.....	pag 073
6.4. Organización estructural y propiedades reguladoras.....	pag 078
6.5. Función de antiportadores NHX.....	pag 084
6.5.1. Tolerancia a la salinidad.....	pag 084
6.5.2. Homeostasis de K⁺.....	pag 089
6.5.3. Regulación de pH celular.....	pag 091
Material yMetodos.....	pag 097
1. Material biológico.....	pag 099
1.1 Bacterias.....	pag 099

1.1.1. Cepas bacterianas utilizadas.....	pag 099
1.1.2. Cultivo bacteriano.....	pag 100
1.1.3. Obtención de células competentes.....	pag 102
1.1.4. Transformación de E. coli.....	pag 102
1.1.5. Transformación de Agrobacterium tumefaciens.....	pag 103
1.2. Levaduras.....	pag 104
1.2.1. Cepas de levadura utilizadas.....	pag 104
1.2.2. Cultivo de levaduras.....	pag 105
1.2.3 Transformación de levaduras.....	pag 107
1.3. Material vegetal.....	pag 108
1.3.1. Germinación de semillas y cultivo de plantas de Arabidopsis.....	pag 108
1.3.2. Germinación de semillas y cultivo de Plantas de tomate.....	pag 110
1.3.3. Transformación de Arabidopsis.....	pag 113
1.3.4. Transformación de tomate.....	pag 114
1.3.5 . Recolección y conservación de semillas De plantas transformadas.....	pag 119
1.3.6. Tratamientos salinos y de deficiencia en potasio.....	pag 120
1.3.7. Determinación del contenido iónico.....	pag 121
2. Métodos.....	pag 122
2.1. Métodos generales de manipulación de ácidos nucleicos.....	pag 122
2.1.1. Amplificación por PCR.....	pag 122
2.1.2. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa.....	pag 123
2.1.3. Extracción y purificación de DNA de geles de agarosa.....	pag 124
2.1.4. Concentración de DNA por precipitación con alcohol.....	pag 124
2.1.5. Cuantificación del DNA o RNA.....	pag 125

2.1.6. Aislamiento de plásmidos	pag 125
2.1.7. Digestión de DNA con enzimas de restricción	pag 126
2.1.8. Clonaje de fragmentos de DNA	pag 126
2.1.9. Creación de vectores de expresión por recombinación entre el vector de entrada y el vector de destino	pag 130
2.1.10. Secuenciación	pag 130
2.1.11. Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis y tomate	pag 131
2.1.12. PCR a tiempo real	pag 131
2.2. Identificación de los antiportadores.....	pag 133
2.2.1. Aislamiento de RNA de tomate	pag 133
2.2.2. Preparación de cDNA de una genoteca λ-zap	pag 134
2.2.3 Clonaje de antiportadores	pag 135
2.2.3.1. PCR anidada.....	pag 135
2.2.3.2. RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>).....	pag 138
2.3. Construcciones génicas utilizadas en los estudios funcionales.....	pag 141
2.3.1. Construcciones para expresión en levadura	pag 141
2.3.2. Construcciones para expresión en plantas	pag 143
2.3.2.1. Sobreexpresión.....	pag 146
2.3.2.2. Silenciamiento.....	pag 147
2.3.2.3. Localización subcelular.....	pag 150
2.4. Estudios de expresión de antiportadores LeNHX en plantas..	pag 153
2.4.1. Determinación de la expresión en distintos tejidos por RT-PCR	pag 154
2.4.2. Determinación de los niveles de expresión de transportadores Lenhx's en especies de tomate sensible y tolerantes al NaCl por PCR en tiempo real	pag 155
2.5. Caracterización funcional de los antiportadores en levadura..	pag 156
2.5.2. Disrupción de SckHA	pag 156

2.5.3. Determinación del crecimiento por el método de goteo (Drop test)	pag 157
2.5.4. Aislamiento de microsomas.....	pag 158
2.5.5. Purificación de proteínas.....	pag 159
2.5.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	pag 161
2.5.7. Tinción de proteínas separadas por electroforesis.....	pag 161
2.5.8. Electrotransferencia e inmunodetección.....	pag 162
2.5.9. Reconstitución en liposomas.....	pag 163
2.5.10. Medida de la actividad de los antiportadores.....	pag 164
2.6. Localización subcelular.....	pag 171
2.6.1. Preparación de las partículas de Oro, DNA y del tejido vegetal	pag 171
2.6.2. Bombardeo y microscopía de fluorescencia/confocal.....	pag 173
2.7. Caracterización del antiportador LeNHX2 mediante sobreexpresión en plantas de Arabidopsis	pag 174
2.7.1. Análisis de la presencia del transgen por PCR	pag 174
2.7.2. Analisis de fenotipos.....	pag 175
2.7.3. Obtención de microsomas.....	pag 175
2.7.4 Purificación de LeNHX2 a partir de las membranas microsomales e inmunodetección	pag 177
2.7.5. Aislamiento de endomembranas en colchón de sacarosa.....	pag 178
2.7.6. Medidas de la actividad antiportadora en vesículas endosomales.....	pag 178
2.8. Caracterización del antiportador leNHX2 mediante silenciamiento génico en tomate.....	pag 180
2.8.1. Análisis de la presencia del transgen por PCR.....	pag 181
2.8.2. Analisis del nivel de silenciamiento.....	pag 181
2.8.3. Analisis de fenotipos.....	pag 182

RESULTADOS	pag 185
1. Identificación de fragmentos de cDNA de tomate que codifican transportadores iónicos de la familia NHX.....	pag 187
1.1. Obtención de cDNAs completos.....	pag 188
2. Estudio de la expresión de los transportadores NHX de tomate.....	pag 195
2.1 Análisis de la expresión de genes LeNXHs en distintos tejidos de la planta.....	pag 195
2.2. Expresión de genes NHXs en cultivares de tomate con distinta tolerancia al NaCl en respuesta a estrés salino y relación con contenido iónico.	pag 196
3. Caracterización funcional de antiportadores LeNHXs en levadura.....	pag 206
3.1. Estudios de complementación.....	pag 206
3.2. Caracterización funcional <i>in vitro</i>	pag 217
3.2.1. Inmunodetección y purificación de proteínas NHX de tomate expresadas en levadura	pag 217
4. Determinación de la actividad de intercambio Cation/H ⁺ de las proteínas NHX de tomate purificadas de levadura.....	pag 219

5. Localización subcelular de LeNHX2, LeNHX3 y LeNHX4.....	pag 223
6. Expresión de LeNHX2 en Arabidopsis y silenciamiento de LeNHX2 en tomate.....	pag 232
6.1 Expresión de LeNHX2 en Arabidopsis.....	pag 233
6.1.1. Detección de las construcciones para la sobreexpresión.....	pag 233
6.1.2. Detección inmunológica de la proteína LeNHX2.....	pag 234
6.1.3. Efecto de la sobreexpresión de LeNHX2 sobre el crecimiento y la tolerancia a la salinidad.	pag 238
6.2. Silenciamiento de LeNHX2 en tomate.....	pag 246
6.2.1. Detección de las construcciones para el silenciamiento de LeNHX2 en las plantas transgénicas	pag 248
6.2.2. Determinación de los niveles de silenciamiento génico.	pag 249
6.2.3. Efecto del silenciamiento de LeNHX2 sobre el crecimiento y la tolerancia a la salinidad de las plantas transgénicas. ...	pag 251
Discusión.....	pag 259
Bibliografía.....	pag 279
Conclusiones.....	pag 319
Anexo I.....	pag 323

