
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Escuela Politécnica Superior de Orihuela

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y Agroambiental



Identificación de regiones reguladoras
del transportador de K^+ de alta afinidad
de Arabidopsis AtHAK5

Trabajo Fin de Grado

Septiembre 2016

Autora: Rosa María Miras López
Tutora: M^a Ángeles Botella Marrero
Cotutor: Francisco Rubio Muñoz

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Nutrición mineral de las plantas y fertilización de los cultivos	1
1.2. El K ⁺ en la agricultura	2
1.3. Funciones del K ⁺ en las plantas	4
1.4. Absorción y transporte de K ⁺	6
1.5. Caracterización molecular de la absorción de K ⁺	10
1.5.1. Canales de K ⁺	10
1.5.2. Transportadores de K ⁺	10
1.6. Regulación postranscripcional de los sistemas de entrada de K ⁺ , AtHAK5 y AKT1	12
1.7. La levadura como sistema heterólogo para estudiar los transportadores de K ⁺ de plantas	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1. Medio y material de trabajo	20
3.2. Plásmidos y material biológico	20
3.3. Medios y condiciones de cultivo	20
3.3.1. SD (Sherman Dextrosa)	21
3.3.2. YPD (Yeast Peptone Dextrose)	22
3.3.3. PA (Fosfato de Arginina)	23
3.4. Transformación de levaduras	25
3.5. Crecimiento de las levaduras en cultivo líquido	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. Obtención de cepas de levadura para el estudio de la complementación funcional	27
4.2. Estudio del crecimiento en medio sólido	30
4.3. Estudio del crecimiento en medio líquido	34
5. CONCLUSIONES	43
6. BIBLIOGRAFÍA	44

Resumen:

El K^+ es un componente imprescindible de las células vivas, y todas deben conservar unos niveles adecuados del mismo para crecer y mantenerse con vida. Concretamente en la agricultura el K^+ es un macronutriente esencial para un correcto desarrollo de las plantas. El objetivo del presente trabajo es adquirir más información sobre las características y la regulación de los sistemas de absorción de K^+ que operan en las plantas. Para ello, nos hemos centrado en el transportador AtHAK5 que se encuentra sometido a una fuerte regulación transcripcional, y en los sistemas CIPK23/CBL1 que producen una regulación postraduccional mediante fosforilación. Además, se ha llevado a cabo un estudio de las deleciones del extremo C- Terminal de AtHAK5, que podrían estar implicadas en la regulación de su actividad, de forma dependiente o independiente a CIPK23/ CBL1.

Abstract:

K^+ is an essential component of living cells and all of them have to conserve an appropriate level of K^+ to grow up and stay alive. Specifically, in agriculture K^+ is an essential macronutrient required for a proper development of plants. The objective of this research is acquired more information about the characteristics and the regulation of the K^+ absorption systems which operate in plants. For that, we have focused in the AtHAK5 transporter, which is under a strong transcriptional regulation, as well as in the CIPK23/CBL1 systems which produce a posttranslational regulation by phosphorylation. In addition, it has been conducted a study of deletions in the AtHAK5 C-Terminal extreme, which could be involved in the regulation of its activity, dependent or independent from CIPK23/ CBL1.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nutrición mineral de las plantas y fertilización de los cultivos

Las plantas requieren al menos 14 elementos minerales esenciales para una nutrición adecuada, además de oxígeno, dióxido de carbono y agua. Son los denominados elementos esenciales (Marschner, 1995; Mengel y col., 2001). La deficiencia de algunos de ellos reduce el crecimiento de la planta y el rendimiento de las cosechas. Las plantas generalmente adquieren los minerales de la solución del suelo. Algunos de ellos se requieren en mayores cantidades, son los denominados macronutrientes: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), mientras que otros, los denominados micronutrientes, se requieren en cantidades más pequeñas: cloro (Cl), boro (B), hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni) y molibdeno (Mo).

Existen áreas geográficas con baja disponibilidad de estos elementos minerales esenciales, por lo que han de ser suplidos mediante el aporte de fertilizantes para obtener una mayor producción en las cosechas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esto puede tener efectos adversos ya que el uso de fertilizantes en la agricultura puede contribuir a la contaminación del medio ambiente. La creciente demanda de estos elementos minerales esenciales debido al continuo crecimiento de la población mundial, así como la expansión de la agricultura a zonas menos productivas, ha aumentado el coste de los fertilizantes y disminuido el uso eficiente de los mismos (Rengel y Damon, 2008).

Independientemente de los efectos beneficiosos de la aplicación de estos fertilizantes, los costes económicos y medioambientales de su aplicación (Galloway y col., 2008; Ju y col., 2009) hacen necesario optimizar la eficiencia en su uso. Esto se puede conseguir a través de una mejora en las prácticas de la gestión de los fertilizantes y/o genéticamente, usando cultivos que adquieran y/o utilicen los elementos minerales de una forma más eficaz (Hirel y col., 2007; Ju y col., 2009; Rengel y Damon, 2008).

De forma global, la materia vegetal que se recoge en los cultivos contiene 75, 14 y 60 millones de toneladas de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) respectivamente. Mientras que la aplicación de N y P se encuentra en niveles muy similares a los que son retirados del suelo por los cultivos (80 y 14 millones de toneladas respectivamente), el K^+ se aplica a un nivel bastante inferior, reponiendo solo el 35% del K^+ retirado (Römheld y Kirkby, 2010), valores que pueden llegar a ser mucho menores en países en vías de desarrollo.

1.2. El K^+ en la agricultura

El consumo global de K^+ aumentó un 4,4% por año en el periodo 1999- 2005 (IFA2005). Tomando como ejemplo el arroz (4- 8 t ha de grano suponen la retirada de 56- 112 Kg de K^+ del suelo (Yang y col., 2004), se estima que la demanda anual de K^+ que se necesitará en el año 2025 ascenderá a 9- 15 Mt, o lo que es lo mismo, aproximadamente 1,7 veces el requerimiento de K^+ de 1990 (Dobermann y col., 1998). Aunque las reservas globales de K^+ parece que son suficientes para cientos o incluso miles de años de agricultura (Sheldrick y col., 1985), la rentabilidad de la producción agrícola en suelos marginales o en condiciones de estrés biótico y abiótico dependerá, cada vez más, de una mejora en el uso eficiente de K^+ y de los otros nutrientes (Rengel y Damon, 2008).

La solución del suelo es la fuente fundamental de K^+ para la absorción del mismo por parte de las raíces de la planta. Aunque esta fuente tiene un bajo contenido en este mineral, representando solo el 5% de la demanda total del cultivo, o el 0,1- 0,2% del K^+ total del suelo, está disponible de forma inmediata y es repuesto continuamente tanto por el K^+ intercambiable (EK, del inglés exchangeable potassium, K^+ de alta disponibilidad para la planta) como el K^+ intercambiable lentamente o no intercambiable (SEK, del inglés slowly exchangeable potassium, K^+ de baja disponibilidad para la planta). La última fuente de K^+ , que soporta el 90- 98% del K^+ total presente en el suelo, se encuentra en la estructura de los minerales ricos en este elemento, como micas o feldspatos. Este K^+ va reponiendo lentamente las otras dos fuentes de K^+ (EK y SEK), como se indica en la Figura 1 (Römheld y Kirkby, 2010).

1.3. Funciones del K⁺ en las plantas

Las plantas deben tomar el K⁺ desde la solución del suelo, donde las concentraciones del mismo varían entre 0,1 mM y 1 mM de K⁺ (Maathuis, 2009). Esto contrasta con la concentración de K⁺ en el citoplasma celular, que se mantiene constante en torno a un valor de 100 mM. Por lo que la elevada demanda de K⁺ por parte de la planta ha de estar en consonancia con una eficiente absorción y transporte hacia la parte aérea.

El K⁺ puede suponer hasta el 10% del peso seco de una planta, por lo que, como se ha mencionado anteriormente, es considerado como un macronutriente (Leigh y Jones, 1984). En cuanto a las funciones del K⁺ en las plantas, éste juega un papel biofísico y bioquímico fundamental. Al estar cargado positivamente y ser tan abundante, es un estabilizador de moléculas cargadas negativamente como los ácidos nucleicos y las proteínas (Figura 2).

El K⁺ muestra una alta movilidad en las plantas, transportándose entre raíz y parte aérea por el xilema y el floema, y dentro de la parte aérea de unas hojas a otras (Karley, A.J. y White, P.J., 2009). El K⁺ se acumula en la vacuola, lo que permite los movimientos de la planta, tales como la apertura y cierre de los estomas, el movimiento de las hojas, y otros tropismos de las plantas que se producen por la presión de turgor generada por el K⁺ (Maathuis y Sanders, 1996; Philippar y col., 1999) (Figura 2). La presión osmótica originada por la acumulación de K⁺ es también utilizada para conducir la expansión celular y de las hojas (Elumalai y col., 2002); Maathuis y Sanders, 1996; Ruan y col., 2001). El K⁺ también es considerado un osmolito compatible que contribuye al mantenimiento del estado hídrico de la planta, lo que es fundamental en la mayoría de estreses abióticos (Mahouachi y col., 2006).

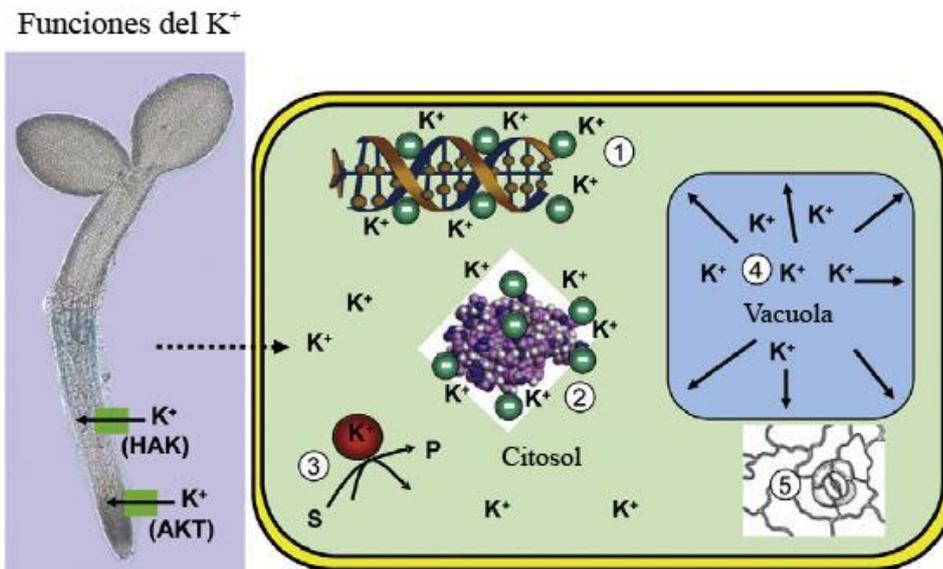


Figura 2. Funciones del K^+ . El K^+ se absorbe a través de los transportadores (HAK) y canales (AKT). Dentro de la planta, las características intrínsecas del K^+ lo hacen idóneo para neutralizar las cargas negativas de los ácidos nucleicos (1) y las proteínas (2). Además, el K^+ activa enzimas específicas (3) actuando como cofactor en reacciones enzimáticas entre el sustrato (S) y el producto (P). Al ser el principal catión en las vacuolas (4), el K^+ genera presión de turgor al arrastrar agua, para proporcionar una estructura definida y conducir la expansión celular, el crecimiento de la planta y los movimientos de ésta, como la regulación de la apertura y cierre de los estomas (5). Modificado de Maathuis 2009.

El K^+ es necesario para las reacciones metabólicas por su capacidad de activar numerosos enzimas (Figura 2). Las concentraciones más altas de K^+ se encuentran en tejidos jóvenes en desarrollo y órganos reproductores, indicando su importancia en el metabolismo celular y en el crecimiento. La síntesis de proteínas mediada por el ribosoma es otro proceso clave que requiere altas concentraciones de K^+ (Maathuis y Sanders, 1994; Rodríguez- Navarro y Rubio, 2006). Por otro lado, el aumento de K^+ genera un aumento en la fotosíntesis, y un transporte más efectivo de fotoasimilados y compuestos amino nitrogenados hacia órganos reproductores vía floema.

El estatus del K^+ en la planta puede afectar también al metabolismo a través de la regulación transcripcional y postranscripcional de los genes que codifican enzimas metabólicas (Amtmann y Armengaud, 2009); Armengaud y col., 2009). También se ha descrito la acumulación de azúcares reductores y la absorción de ácidos orgánicos y aminoácidos cargados negativamente como una consecuencia directa de la deficiencia de K^+ (Amtmann y col., 2008).

El K^+ también juega un papel importante en la señalización del estrés (Römheld y Kirkby, 2010; Wang y Wu, 2010), ya que la deficiencia de K^+ induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ácido jasmónico (JA), relacionadas con la tolerancia a enfermedades y plagas, así como la producción de etileno y auxinas. Por todo ello, la optimización del estado nutricional de K^+ es importante para reducir los efectos negativos de los distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Amtmann y col., 2008; Troufflard y col., 2010).

En condiciones deficitarias de K^+ las raíces responden mediante dos mecanismos de adaptación; el primero consiste en la activación de los sistemas de adquisición y movilización del nutriente; el segundo se refiere a procesos del desarrollo de la raíz, lo que incluye un aumento de la raíz primaria, formación de raíces laterales y elongación de los pelos radicales (Jung y col., 2009).

La deficiencia de K^+ se manifiesta inicialmente como necrosis que se desarrolla en primer lugar en las puntas y márgenes de las hojas y entre las venas, y que posteriormente se desarrolla hacia la base de la hoja. Puesto que el K^+ puede ser movilizado a las hojas jóvenes, estos síntomas aparecen en primer lugar en las hojas viejas (Marschner, 1995).

1.4. Absorción y transporte de K^+

La absorción de K^+ por la raíz se produce a través de los pelos radicales, que son células epidérmicas especializadas que aumentan la superficie de contacto con la solución del suelo, así como a través de las células de la epidermis y del córtex de la raíz (Figura 3). Una vez que el K^+ ha alcanzado la superficie de la raíz, éste ha de llegar hasta la estela donde se encuentran los vasos xilemáticos y traqueidas. Dichos elementos del xilema son los encargados del transporte del K^+ hacia la parte aérea, donde nuevamente tendrá que ser conducido a través de los distintos tejidos a todas las células de la planta.

Para llegar a la estela, el K^+ atraviesa los tejidos de la raíz camino del xilema por dos posibles rutas paralelas (Figura 3): una de ellas es la denominada ruta apoplástica, que es aquella en la que el K^+ circula por el espacio denominado apoplasto, que

corresponde a la parte de la planta fuera de la membrana plasmática de las células vivas, es decir, la pared celular y los espacios intercelulares. Esta ruta quedaría interrumpida al llegar a la endodermis, debido a la banda de Caspary. Esta banda, que se extiende longitudinalmente alrededor de la estela y que está compuesta mayoritariamente de lignina y suberina, ejerce la función de barrera hidrofóbica impermeable en la matriz intercelular, limitando por tanto el paso de K^+ vía apoplasto hasta el xilema. La otra ruta es la denominada ruta simplástica, que se denomina así porque transcurre por el simplasto, es decir, el continuum de los citoplasmas interconectados por plasmodesmos y excluyendo las grandes vacuolas de las células vegetales. Ya que en el camino hacia la estela la banda de Caspary impide la ruta apoplástica, la única posibilidad para que el K^+ llegue a los vasos del xilema es por la vía simplástica. Esto implica que en algún punto el nutriente debe atravesar una membrana plasmática, ya sea en la rizodermis, en el parénquima cortical o, en última instancia, en la endodermis. Debido a que la bicapa lipídica es impermeable al K^+ , la entrada de éste en el simplasto se produce a través de proteínas de membrana que constituyen los sistemas de transporte de K^+ . Estos sistemas son el primer punto de control de la absorción de K^+ y son fundamentales, por lo tanto, para la correcta nutrición de las plantas.

Debido a que el requerimiento de K^+ afecta a todas las células de un organismo, tras entrar a la planta, éste tiene que transportarse a los distintos órganos a través del xilema, atravesando para ello distintos tipos de células. Como se dijo anteriormente, en la mayoría de las células la concentración de K^+ en el citoplasma es bastante similar en condiciones no estresantes, alrededor de 100 mM (Cuin y col., 2003; Walker y col., 1996a). Sin embargo, la concentración externa de K^+ y los valores de pH a los que están expuestas las distintas células son muy variables (Leigh y Jones, 1984). Por ello, no es sorprendente que exista un elevado número de genes que codifiquen transportadores de K^+ y canales, que permitan el transporte de K^+ en distintas condiciones, tejidos y tipos de células (Maser y col., 2002; Maser y col., 2001; Very y Sentenac, 2002, 2003)

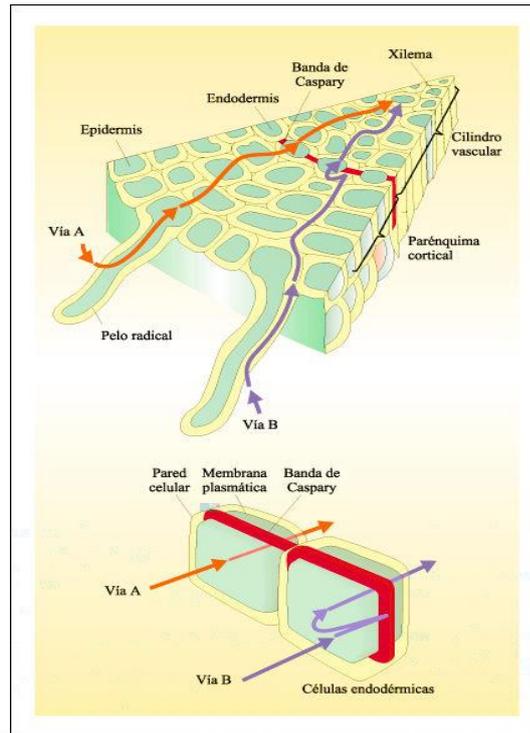


Figura 3. Esquema de un corte transversal de una raíz que muestra las dos vías de absorción de sustancias. Parte de los solutos y del agua que entra en la raíz siguen la vía apoplástica (B). Los solutos también pueden entrar al interior de la planta por la vía simplástica (A), y para atravesar la banda de Caspary, tanto el agua como los solutos tienen que ser transportados a través de las membranas celulares de las células endodérmicas.

En la década de los 50 del siglo pasado, Epstein propuso considerar los sistemas de transporte de iones como enzimas y utilizar análisis cinéticos para su estudio (Epstein y Hagen, 1952). Aplicando el concepto de cinética enzimática para estudiar la absorción de K^+ por la raíz de plantas de cebada y usando Rb^+ como análogo al K^+ , observó que la velocidad de absorción de K^+ exhibía una cinética bifásica en respuesta al incremento en la concentración de K^+ en el medio externo (Epstein y col., 1963) (Figura 4). Estos estudios pusieron de manifiesto que al menos existían dos sistemas de transporte de K^+ implicados en la absorción del mismo. El primero era un sistema de alta afinidad que mostraba una K_m por K^+ de $21 \mu M$, se saturaba a concentraciones de K^+ en el rango micromolar, era selectivo por K^+ y Rb^+ , y no se veía prácticamente afectado por el Na^+ . El segundo era un sistema de baja afinidad, que mediaba la absorción de K^+ a concentraciones más altas de este catión, mostraba una K_m por K^+ de $11,4 mM$, era saturable y se inhibía por Na^+ (Epstein y col., 1963) (Figura 4). Esta cinética bifásica se ha descrito posteriormente en otras especies vegetales y parece ser un modelo universal.

Para explicar la cinética bifásica descrita por Epstein en 1963 se propuso la existencia de dos sistemas de transporte, o más, actuando en paralelo (Welch y Epstein, 1968). La absorción en el rango de la alta afinidad, o mecanismo I, se supone mediada por un transportador del tipo simporte K^+/H^+ mientras que el mecanismo II, o de baja afinidad, parece estar mediado por canales de K^+ rectificadores de entrada (Maathuis y col., 1997).

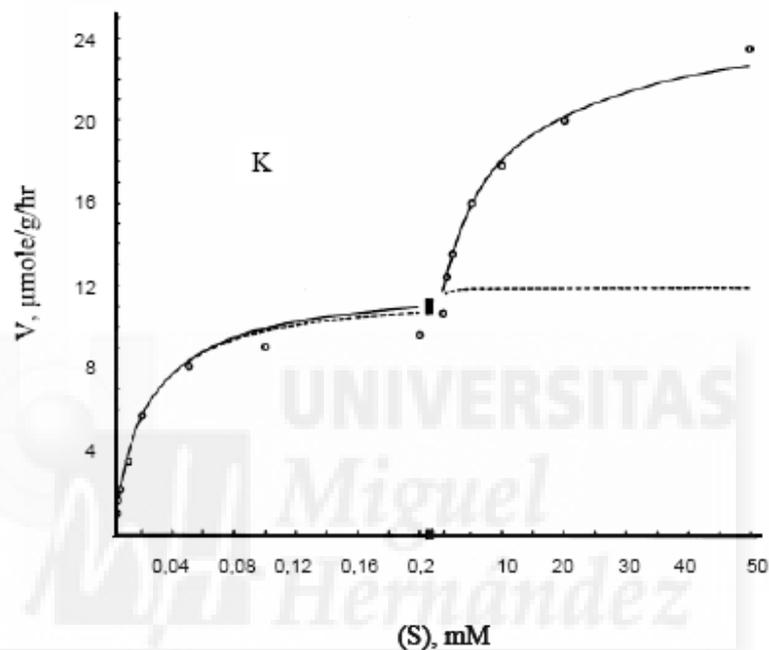


Figura 4. La absorción de K^+ por raíces de cebada sigue una cinética bifásica, en la cual el primer componente (I) muestra una absorción en el rango micromolar denominada de alta afinidad y un segundo componente (II) con una absorción predominante en el rango de concentraciones milimolares denominada de baja afinidad. Modificado de Epstein 1963.

Para la caracterización del mecanismo implicado en la entrada de K^+ de alta afinidad ha sido de gran utilidad el empleo del hongo *Neurospora crassa*. Las células de los organismos eucariotas con pared celular, como son las de los hongos y las plantas, comparten muchas de sus características. En ambas, la energía de la membrana plasmática se basa en la creación de un gradiente electroquímico de H^+ mediante una bomba de H^+ que hidroliza ATP. Dicho gradiente es utilizado posteriormente para el transporte de solutos en contra de sus gradientes electroquímicos. En *N. crassa* los estudios electrofisiológicos y de flujo iónico permitieron demostrar que la entrada de K^+

de alta afinidad estaba mediada por un simporte K^+/H^+ de estequiometría 1:1 (Rodríguez-Navarro y col., 1986). En *Arabidopsis thaliana* también se ha postulado la existencia de un mecanismo similar para la entrada de K^+ de alta afinidad (Maathuis y Sanders, 1994). Este mecanismo permitiría a los hongos y las plantas absorber K^+ en contra de altos gradientes de concentración, lo que no sería posible a través de canales.

1.5. Caracterización molecular de la absorción de K^+

La identificación de los genes implicados en la absorción de K^+ comenzó en los años 90 -del pasado siglo- mediante la complementación funcional en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura posee dos genes implicados en la absorción de K^+ , TRK1 y TRK2 (Rodríguez-Navarro, 2000), los cuales codifican transportadores que hacen posible la absorción de K^+ y el crecimiento de ésta a concentraciones micromolares de K^+ externo. Se han empleado con mucha frecuencia levaduras que tienen interrumpidos ambos genes para el estudio de canales y transportadores de K^+ de plantas.

1.5.1. Canales de K^+

En 1992, la complementación funcional en una levadura mutada en TRK1 con una genoteca de cDNA de *A. thaliana* permitió el aislamiento de dos cDNAs, AKT1 y KAT1 (Schachtman, 1992; Sentenac y col., 1992). Se sugirió que AKT1 podría participar en el aporte sostenido de K^+ en el tiempo (Gaymard y col., 1996; Schachtman, 1992) y por lo tanto en la absorción de K^+ de baja afinidad.

1.5.2. Transportadores de K^+

En 1995 se describió en la levadura *Schwanniomyces occidentalis*, un transportador de K^+ de alta afinidad, SoHAK1 (Bañuelos y col., 1995). Este transportador era homólogo al transportador KUP de *Escherichia coli* y fue caracterizado funcionalmente en el doble mutante *trk1-*, *trk2-* de *S. cerevisiae*. En este sistema heterólogo de expresión, SoHAK1 mediaba transporte de K^+ de alta afinidad, no discriminaba entre K^+ y Rb^+ y era capaz de concentrar el K^+ más de 6 órdenes de magnitud.

fuertemente cuando se suprime el aporte de K^+ (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006), mientras que la restauración del mismo reduce rápidamente la cantidad de su mRNA (Ahn y col., 2004; Armengaud y col., 2004; Nieves-Cordones y col., 2008). Todos estos transportadores muestran unas características cinéticas de transporte de K^+ al expresarlos en levadura similares a las mostradas por las respectivas plantas. Esto indica que estos transportadores median la absorción de K^+ de alta afinidad en las raíces o, al menos, son los componentes principales de esta absorción (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Estudios con líneas de inserción de T-DNA en AtHAK5 han permitido demostrar que este transportador contribuye en gran medida al transporte de K^+ de alta afinidad en *Arabidopsis*, siendo el responsable del componente sensible al NH_4^+ (Gierth y col., 2005; Rubio y col., 2008).

1.6. Regulación postranscripcional de los sistemas de entrada de K^+ , AtHAK5 y AKT1.

Son numerosos los estudios que han profundizado en la regulación de los genes tipo HAK1, entre ellos AtHAK5, descubriendo una regulación mucho más compleja de lo esperado (Figura 6). La concentración de K^+ en el apoplasto y el potencial de membrana se han propuesto como los primeros pasos en la ruta de señalización para la aclimatación frente a bajas concentraciones de K^+ (Amtmann y col., 2006). Esto es debido a que las concentraciones externas de K^+ tienen una influencia relativamente pequeña en la concentración de K^+ en el citosol, ya que son controladas eficientemente por el K^+ vacuolar (Walker y col., 1998; Walker y col., 1996b). Uno de los primeros efectos hallados durante la deficiencia de K^+ es la hiperpolarización del potencial de membrana celular de la raíz, la cual aparece tras solo unos minutos del descenso del K^+ externo (Maathuis y Sanders, 1993; Wang y Wu, 2010). En estudios con tomate se ha relacionado directamente el potencial de membrana de las células de la raíz con la expresión de LeHAK5 en las mismas, sugiriendo que la hiperpolarización de la membrana está directamente relacionada con el aumento de la expresión del gen que codifica el transportador (Nieves-Cordones y col., 2008).

Otros elementos importantes en la regulación de los genes tipo HAK1 son las ROS y las hormonas. Las ROS y el etileno aumentan cuando las plantas son ayunadas de K^+ (Jung y col., 2009; Shin y Schachtman, 2004).

Por otra parte, la salinidad afecta considerablemente la expresión de estos genes, ya que altas concentraciones de Na^+ despolarizan el potencial de la membrana plasmática y reprimen la expresión de los genes tipo HAK1. Esto se ha demostrado con el descenso de los transcritos de LeHAK5 (Nieves-Cordones y col., 2007; Nieves-Cordones y col., 2008), AtHAK5 (Nieves-Cordones y col., 2010) y ThHAK5 (Alemán y col., 2009a) cuando se aplicaba ayuno de K^+ a las plantas en presencia de Na^+ .

En *Arabidopsis*, el nivel de transcripción del canal AKT1 es insensible a las concentraciones de K^+ externo (Lagarde y col., 1996; Pilot y col., 2003), sin embargo la actividad del canal parece estar regulada por fosforilación. En condiciones de deficiencia de K^+ , se registra una señal de Ca^{2+} por los sensores de Ca^{2+} CBL1 y CBL9 (proteínas similares a la Calcineurina-B, del inglés, Calcineurin-B Like Proteins) que activan la proteína quinasa CIPK23 (Proteína quinasa de interacción con CBLs, del inglés, CBL-Interactin Protein Kinase). Ésta fosforila a AKT1 e incrementa la absorción de K^+ a través de este canal (Cheong y col., 2007; Li y col., 2006; Luan y col., 2009; Xu y col., 2006). Además, recientemente, también se ha demostrado que el complejo CIPK23/CBL1 fosforila y activa el transportador AtHAK5 (Ragel y col., 2015). Siendo los homólogos de HAK5 presentes en pimiento y tomate, activados también por el complejo CIPK23/CBL (Ragel y col., 2015).

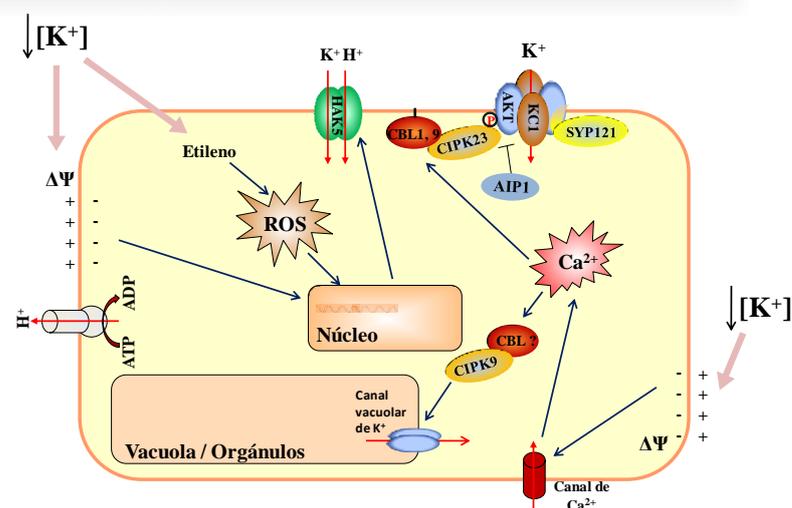


Figura 6. Señalización frente a bajas concentraciones de K^+ en las células de las plantas. Las bajas concentraciones de K^+ inducen una hiperpolarización de la membrana plasmática, lo que puede ser uno de los primeros pasos en esta señalización. La membrana plasmática hiperpolarizada activa la expresión de AtHAK5. Además, el bajo K^+ activa una señalización etileno – ROS que termina produciendo la inducción de AtHAK5. Esta baja concentración de

K^+ también desencadena una señalización por Ca^{2+} , probablemente a través de la activación de canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática y de las endomembranas, que llevan a la activación de AKT1 a través del complejo CBL1/9-CIPK23, así como la activación de canales vacuolares mediante la interacción de algún miembro de la familia CBL con CIPK9, aumentando la entrada de K^+ hacia el citosol. AKT1 es activado mediante una fosforilación llevada a cabo por CIPK23, e inactivado por una defosforilación mediada por AIP1. La actividad de AKT1 está además regulada por la interacción con la subunidad AtKC1 y la syntaxina SYP121. Modificado de Alemán 2011.

Como se ha mencionado anteriormente, una clara demostración de la contribución de AtHAK5 y AKT1 a la absorción de K^+ no ha sido posible hasta recientemente, cuando se han podido usar líneas de inserción de T-DNA e inhibidores selectivos en la planta modelo *Arabidopsis* (Gierth y col., 2005; Hirsch y col., 1998; Nieves-Cordones y col., 2010; Pyo y col., 2010; Qi y col., 2008; Rubio y col., 2010; Rubio y col., 2008; Spalding y col., 1999). Los estudios con líneas de inserción de T-DNA muestran que AtHAK5 es el único sistema que media en la absorción de K^+ cuando la concentración externa de éste es menor de $10 \mu M$ (Nieves-Cordones y col., 2010; Qi y col., 2008; Rubio y col., 2010b) (Figura 7). Por ello, es bastante posible que AtHAK5 medie el simporte K^+/H^+ sugerido por los estudios in vivo (Maathuis y Sanders, 1994). A concentraciones más altas, la absorción de K^+ también se realiza a través del canal AKT1, siendo ambos sistemas los que contribuyen a la adquisición de K^+ por parte de la planta a concentraciones de entre 10 y $200 \mu M$ de K^+ (Rubio y col., 2010b) (Figura 7). De hecho, se ha demostrado que la línea *athak5* no muestra un fenotipo deficiente en el crecimiento en placas con agar que contienen una concentración de K^+ de $30 \mu M$ (Pyo y col., 2010), sugiriendo que la pérdida de AtHAK5 se puede compensar completamente con AKT1 a estas concentraciones. A concentraciones externas mayores de $500 \mu M$, AtHAK5 no es relevante, siendo la contribución de AKT1 a la absorción de K^+ fundamental (Figura 7). La línea *atakt1* crece en menor medida que la línea silvestre y que la línea *athak5*, las cuales crecen de forma similar, a una concentración externa de K^+ de $500 \mu M$ (Rubio y col., 2010a). Por último, una línea doble mutante *athak5, atakt1* (Pyo y col., 2010; Rubio y col., 2010a) no absorbe Rb^+ a concentraciones menores de $100 \mu M$, demostrando que AtHAK5 y AKT1 son los únicos sistemas que operan en el rango de concentraciones de alta afinidad (Alemán y col., 2011). A concentraciones de K^+ superiores a $100 \mu M$, otros sistemas hasta ahora no identificados parecen estar implicados en la absorción de K^+ en las plantas *athak5, atakt1*.

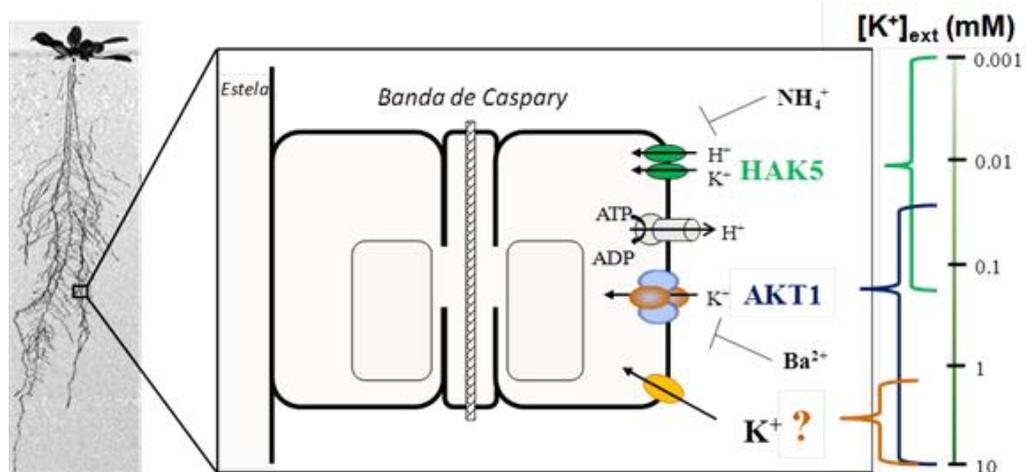


Figura 7 Adquisición de K^+ en la raíz de *A. thaliana*. AtHAK5 es el único sistema que absorbe K^+ a concentraciones externas del mismo menores de $10 \mu\text{M}$, probablemente mediante un simporte K^+/H^+ . A concentraciones más elevadas, la absorción de K^+ también se produce a través del canal AKT1, siendo ambos sistemas los responsables de esta absorción entre 10 y $200 \mu\text{M}$. A concentraciones superiores a $500 \mu\text{M}$, AKT1 es el único sistema encargado de la absorción de K^+ . AtHAK5 es el componente sensible a NH_4^+ de la absorción de K^+ , mientras que AKT1 es el componente sensible a Ba^{2+} . En ausencia de AtHAK5 y AtAKT1, sistemas no identificados son los encargados de la absorción de K^+ que permiten el crecimiento de la planta a concentraciones mayores de 1 mM . Tomado de Alemán 2011.

Existen cuatro familias de sistemas de transporte de K^+ en plantas: canales Shaker, canales de KCO, transportadores HKT y transportadores HAK (Very and Sentenac, 2003). Los miembros de las tres primeras familias presentan dominios posiblemente derivados de un canal ancestral que podrían formar un poro de unión y transporte de K^+ . Este dominio está presente en los canales de K^+ de todos los reinos (Mackinnon, 2003; Very and Sentenac, 2003; Corratgé-Faillie et al., 2010; Benito et al., 2014). Dicho dominio no se encuentra en los transportadores de la familia HAK. Esto y los escasos estudios sobre las estructuras funcionales de los transportadores HAK, hace que la identificación de sus dominios funcionales sea un campo inexplorado interesante para su investigación.

Se han encontrado algunos aminoácidos de AtHAK5 importantes para la actividad de la proteína. Existen estudios precedentes donde se produjeron mutaciones puntuales espontáneas o mediante PCR mutagénica al azar en AtHAK5. Dichas mutaciones son capaces de aumentar la velocidad máxima de unión del transportador por este ion (Rubio y col., 2000; Aleman y col., 2014). En la mutación L776H se ha cambiado la leucina 776 por Histidina, siendo capaz de aumentar la velocidad máxima

de absorción de K^+ , y haciendo posible que la cepa transformada 9.3 (*trk1*, *trk2*) pueda crecer en medios con baja concentración de K^+ . Existe otra mutación denominada F130S, en la que se cambia la fenilalanina de la posición 130 por serina, dando lugar a un transportador con una velocidad máxima aumentada así como una mayor afinidad por el K^+ . Dichas mutaciones que ocasionan el aumento de la actividad, podrían estar relacionadas con los dominios implicados en la activación del transportador.

Por otra parte, teniendo en cuenta la estructura secundaria deducida de la secuencia de aminoácidos de AtHAK5, se observa que, después del último segmento transmembrana, existe un dominio C- Terminal bastante largo (Figura 8). Dicho dominio está muy probablemente localizado en el lado citoplasmático y podría contener regiones implicadas en la regulación de la activación del transportador mediante interacción con otras proteínas reguladoras. No existe sin embargo ningún estudio sobre la función de este extremo de la proteína en ningún transportador de esta familia.

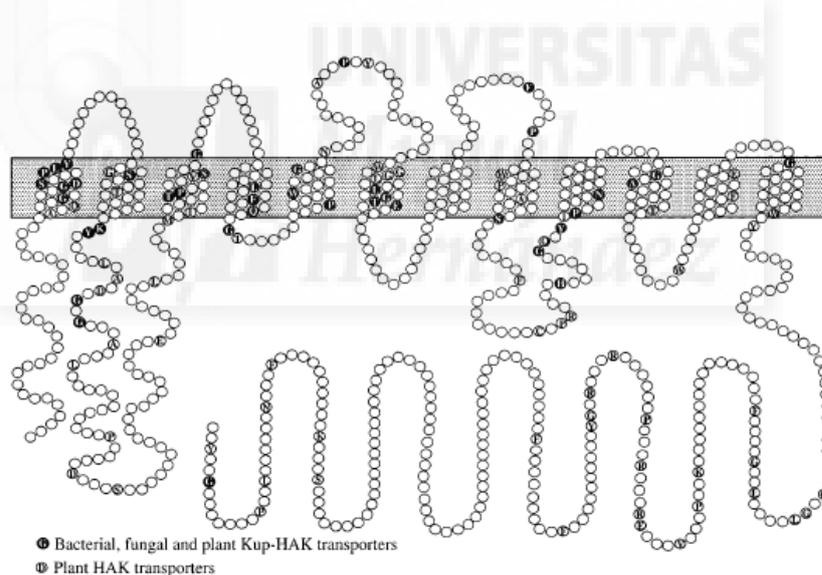


Figura 8. Modelo de estructura secundaria deducida para el transportador AtHAK5. Se observan 12 segmentos transmembrana unidos por lazos citoplasmáticos o externos y un último extremo C-Terminal localizado en la cara citoplasmática (Rubio y col., 2000).

1.7. La levadura como sistema heterólogo para estudiar los transportadores de K^+ de plantas.

Saccharomyces cerevisiae es un hongo ambiental común y es un componente transitorio de las microbiotas digestiva y cutánea humanas. Se utiliza ampliamente en la

elaboración de vino, cerveza, pan y otros alimentos. Conocida desde la antigüedad, se ha convertido en un organismo de estudio común en el laboratorio. Además, este organismo ha ganado protagonismo en el laboratorio al convertirse en un potente modelo biológico de organismos eucariotas.

Pertenece al Reino *Fungi*, División *Ascomycota*, Clase *Hemiascomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae*, Genero *Saccharomyces*, Especie *cerevisiae* (CSIC, 2016).

La secuenciación completa del genoma de *S. cerevisiae*, concretamente de la cepa de laboratorio S288C, se finalizó en 1996 tras cuatro años de un proyecto liderado por la Unión Europea y la participación de más de cien laboratorios de todo el mundo. Fue el primer organismo eucariota en ser secuenciado y actualmente es el genoma eucariota mejor conocido. Sus 12 millones pares de bases de su genoma contienen cerca de 6000 genes y se conoce la función de prácticamente de todos ellos. Es unas cuatro veces mayor que el de *E. coli* y unas doscientas veces más pequeño que el humano (CSIC, 2016).

A pesar de los mil millones de años de divergencia evolutiva, más de una tercera parte de los genes de la levadura se encuentran también en humanos (homólogos) y en muchos casos realizan funciones similares (ortólogos). De éstos, decenas, si no cientos, corresponden a genes relacionados con enfermedades hereditarias, metabólicas o con el cáncer. La similitud entre los sistemas celulares fundamentales (división celular, cromosomas, respuesta al estrés y metabolismo primario, entre otros) de la levadura y de los animales superiores y de las plantas ha consolidado a la levadura como modelo eucariota, a nivel celular y molecular. A la vez, ha demostrado tener un enorme potencial como herramienta tecnológica para la biología molecular al permitir establecer con relativa facilidad la relación entre la estructura genética y la función de la proteína. Además, aporta muchas ventajas técnicas como rápido crecimiento, la facilidad con la que se replican cultivos y aíslan mutantes y su ausencia de patogenicidad (CSIC, 2016). La Figura 9 muestra el ciclo celular de *S. cerevisiae*.

En lo que respecta a este trabajo, muchos de los sistemas de transporte de K^+ de plantas se han caracterizado mediante complementación funcional en cepas de levadura. Para ello se han utilizado cepas mutantes que tienen anulada la función de los

principales sistemas de transporte de K^+ TRK1 TRK2. Así, mediante el empleo de cepas $trk1^-$, $trk2^-$, se han definido las características cinéticas de los transportadores de K^+ de alta afinidad HAK de cebada (Santa-María y col., 1997), *Arabidopsis* (Rubio y col., 2000), tomate (Nieves-Cordones y col., 2008), arroz (Bañuelos y col., 2002), y de otras muchas especies.

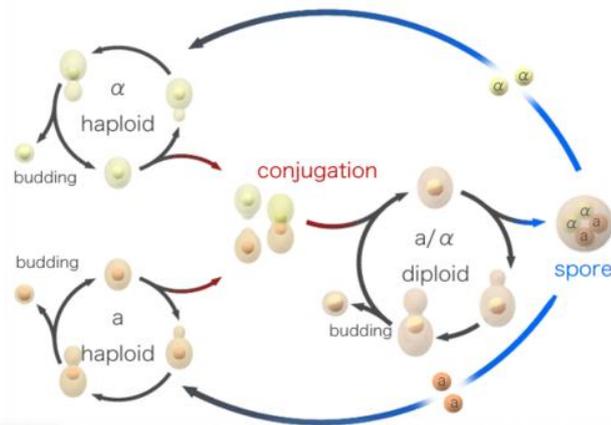


Figura 9. Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Progresión de la fase haploide a la fase diploide hasta la creación de las esporas.



2. OBJETIVOS

Independientemente de los efectos beneficiosos de la aplicación de K^+ al suelo, los costes económicos y medioambientales hacen necesario optimizar la eficiencia en su uso por parte de los cultivos. Para ello, es fundamental conocer la regulación de los sistemas del transporte de K^+ y cómo se adapta su funcionalidad a diversas condiciones medioambientales. En muchos casos la nutrición de K^+ se ve limitada por una baja disponibilidad del mismo o por la presencia de estreses abióticos como la salinidad, por lo que se hace necesario profundizar en el conocimiento de los procesos moleculares generales y específicos implicados en la respuesta de las plantas ante deficiencias nutricionales y estreses abióticos.

El transportador AtHAK5 se encuentra sometido a una fuerte regulación transcripcional. Además, recientemente se ha demostrado que existe también una regulación postraducciona mediante fosforilación por el sistema CIPK23/CBL1. Por otra parte se ha identificado un extremo C-Terminal en AtHAK5 que podría estar implicado en la regulación de su actividad, de forma dependiente o independiente a CIPK23/CBL1.

Teniendo en cuenta todo ello, y para profundizar en los mecanismos de regulación de la actividad de AtHAK5, se plantean los siguientes objetivos en el presente trabajo.

1. Llevar a cabo un estudio de deleciones del extremo C-Terminal de AtHAK5, determinando el efecto de deleciones seriadas de dicho dominio sobre la funcionalidad del transportador AtHAK5.
2. Determinar si el sistema CIPK23/CBL1 es capaz de activar los transportadores delecionados en el extremo C-Terminal.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Medio y material de trabajo

La elaboración de los experimentos se ha llevado a cabo en medio estéril, bajo una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones externas. Tanto el material empleado –puntas de micropipetas, agua destilada, microtubos, material volumétrico, placas de cultivo- como los medios de cultivo, fueron sometidos a un proceso de esterilización, previamente a su utilización, en un autoclave con unas condiciones de sobrepresión de 1 atmósfera y 120°C durante 20 minutos.

3.2. Plásmidos y material biológico

Saccharomyces cerevisiae 9.3 es nuestra cepa control, y de la que provienen las diferentes cepas de estudio (MATa, ena1D:HIS3:ena4D, leu2, ura3, trp1, ade2, trk1D, trk2;pCK64). Se trata de un mutante nulo de los genes encargados de codificar para TRK1 y TRK2 –proteínas que corresponden a los transportadores de K⁺ de la especie *S. cerevisiae* y que además median la captación de K⁺ de alta afinidad-.

Se usaron dos plásmidos, además de *S. cerevisiae* 9.3, para la construcción de nuevas cepas transformadas. El primer plásmido es pGPD414, el cual se encuentra vacío, solo con marcador de síntesis de Triptófano. Puede contener o no cDNA de los factores que actúan en la regulación y activación de HAK5, los genes CIPK23 y CBL1. El segundo plásmido es pDR195 y se encuentra vacío, solo con marcadores de síntesis de Uracilo. Este puede contener o no cDNA de HAK5 con las diferentes deleciones de AtHAK5 que se han obtenido en el laboratorio mediante PCR.

3.3. Medios y condiciones de cultivo

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En nuestro trabajo hemos empleado medios líquidos o caldos que contenían los nutrientes en solución acuosa. Y sólidos, a los que se les añadía agar al medio líquido.

Para un buen desarrollo de las levaduras, se necesita mantener unas condiciones adecuadas respecto a temperatura, presión atmosférica, humedad, oxígeno y pH. Además, el medio debe contener los nutrientes y factores de crecimientos necesarios para las muestras, y mantener todo ello en unas condiciones asépticas adecuadas. Las muestras con las que hemos trabajado derivan de la levadura *S. cerevisiae*, por lo que las condiciones que debíamos de mantener eran de 22°C a 29°C, 1 atmósfera de presión y un pH ligeramente ácido para favorecer el crecimiento fúngico sobre el bacteriano. Un factor muy importante a tener en cuenta, son las diferentes concentraciones que hemos utilizado de K^+ , dado que nuestro experimento está relacionado con este ion y las proteínas transportadoras implicadas en su absorción.

3.3.1. SD (Sherman Dextrosa)

Este es un medio de cultivo en el que como fuente de factores de crecimiento y vitaminas se utiliza una base nitrogenada, sulfato amónico como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono. También se le añaden los requerimientos necesarios en función de las auxtrofías de la cepa de levadura utilizada. En este trabajo la cepa *S. cerevisiae* 9.3, requiere de la adición de uracilo, leucina, triptófano, histidina y adenina, y como además es deficiente en los sistemas endógenos de entrada de K^+ , TRK1 y TRK2, se suplementa el medio con 100 mM K^+ , permitiendo así un buen crecimiento de la levadura y evitando la aparición de mutantes espontáneos. Sin embargo, en las cepas transformadas con los plásmidos pDR195 y pGPD414 no se adiciona uracilo ni triptófano al medio.

Para la preparación de este medio se adicionan los ingredientes de la Tabla 1 en agua destilada, también se añade agar al medio si va a ser sólido. Ajustamos el pH a 6,5 con NaOH y se esteriliza la disolución en el autoclave. Seguidamente con una pipeta estéril 25mL se vierte la misma en una placa Petri de 90 cm de diámetro o 75 mL si es una placa cuadrada de 12 x 12cm. Se deja enfriar dentro de la cabina de flujo laminar y cuando se haya solidificado se cierra y sella con parafina y se guarda a 2- 3 °C.

Tabla 1. Componentes para la preparación del medio SD (Sherman Dextrosa). * Cuando los plásmidos con los que se ha transformado la levadura incluyen marcadores de síntesis de Uracilo y Triptófano, se excluyen de su aplicación.

Ingrediente	Concentración
Preparado para cultivo de levaduras (DIFCO)	1.67 g/L
Sulfato amónico NH ₄ SO ₄	5 g/L
Glucosa	20 g/L
Histidina	20 µg/L
Adenina	20 µg/L
Leucina	40 µg/L
Uracilo *	20 µg/L*
Triptófano *	30 µg/L*
Agar bacteriológico	20 g/L

3.3.2. YPD (Yeast Peptone Dextrose)

Para que las muestras de levaduras crezcan bien, se emplea un medio de cultivo mínimamente enriquecido con sales y una fuente de carbono como es la glucosa. Además, se le adiciona peptona (como fuente de nitrógeno) y un extracto de células de levadura hidrolizadas para el aporte de factores del crecimiento y vitaminas., garantizando así un crecimiento rápido, como también se puede comprobar en la fase de crecimiento logarítmica. Este medio se utiliza normalmente como medio estándar y medio de control, puesto que se obtienen buenos resultados de crecimiento con él.

Adicionamos los ingredientes indicados en la Tabla 2, con sus concentraciones correspondientes en agua destilada. Según de si el medio será sólido o no, se añade agar y se esteriliza en autoclave. Tras este proceso, se vierte 25 mL de la disolución en una placa Petri de 90 cm de diámetro, con una pipeta estéril, o 75 mL si es en placas

cuadradas de 12 x 12 cm. Se deja enfriar y solidificar en la cabina de flujo laminar, se encierran y se guardan a 2- 3 °C.

Tabla 2. Componentes para la preparación del medio YPD (Yeast Peptone Dextrose).

Ingrediente	Concentración
Extracto de levadura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glucosa	20 g/L
Agar Bacteriológico	15 g/L

3.3.3. PA (Fosfato de Arginina)

Es un medio de cultivo sintético que contiene: todas las sales, una fuente de nitrógeno (arginina) y de carbono (glucosa), oligoelementos y vitaminas. Este medio es muy útil para cultivar levaduras en diferentes concentraciones de nutrientes (como es el caso del K⁺), por lo que podemos modificarlo a nuestro interés. La preparación del mismo consiste en diluir en agua destilada, los componentes descritos en la Tabla 3 y se enrasa hasta el 90% del volumen final. Seguidamente se ajusta el pH con L-arginina hasta alcanzar un valor de 6,5, y se añade agar bacteriológico al 1,5% en peso, en el caso de que el medio sea sólido. También se adiciona el potasio (KCl) en las concentraciones requeridas según los experimentos y se enrasa al 90% del volumen final. Después de tener todo esto preparado, se esteriliza en el autoclave y una vez finalizado el proceso, se añade 1/10 del volumen final de una disolución de Glucosa al 20% + Vitaminas 100X (Tabla 5) cuando se enfríe la solución.

Tabla 3. Componentes para la preparación del medio PA (Fosfato de Arginina).
 *1000X elementos de traza, es el conjunto de micronutrientes necesarios preparados de forma conjunta en una sola disolución. Dichos micronutrientes y sus correspondientes concentraciones se indican en la Tabla 4.

Ingrediente	Concentración
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄)	8 mM
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	2 mM
Cloruro Cálcico (CaCl ₂)	0.2 mM
1000x elementos traza (micronutrientes)*	1 mL/L
Adenina	20 µg/L
Histidina	20 µg/L
Leucina	40 µg/L
Uracilo	20 µg/L
Triptófano	30 µg/L

Tabla 4. Componentes para la preparación de la disolución 1000X Oligoelementos y micronutrientes.

Ingrediente	Concentración
Ácido Bórico (HBO ₃)	500 mg/mL
Sulfato de Cobre II (CuSO ₄)	40 mg/mL
Ioduro potásico (KI)	100 mg/mL
Sulfato de Manganeso II (MnSO ₄)	400mg/mL
Molibdato de amonio (NH ₄ Molibdate)	900 mg/mL
Sulfato de zinc II (ZnSO ₄)	400 mg/mL
Sulfato de hierro (FeSO ₄)	500 mg/mL

Tabla 5. Componentes para la preparación de la disolución 100X Vitaminas.

Ingrediente	Concentración
Ácido nicotínico (Vit B3)	400 µg/L
Piridoxina (Vit B6)	400 µg/L
Tiamina (Vit B1)	400 µg/L
Ácido pantoténico (Vit B5)	400 µg/L
Biotina (Vit B7)	2 µg/L

3.4. Transformación de levaduras

Se parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* 9.3 como modelo para transformar cada construcción, con su mutación específica, que se va a estudiar. Primeramente se cultiva dicha cepa 9.3 en un medio sólido YPD con una concentración 50 mM de K^+ a 28°C en una incubadora. Una vez crecidas las células tras 24 horas de incubación, se toma un inóculo en un tubo, se agita en el agitador vortex y se utiliza una alícuota para medir la densidad óptica. Tras realizar esta operación, se ajusta la concentración de células para obtener una concentración final de 1,5- 2,0 en 0,5 mL de agua destilada estéril. Centrifugamos el micro tubo a 4000 r.p.m durante 5 minutos y se lavaran las células con agua destilada estéril. Después, se centrifuga una segunda vez durante el mismo tiempo y con las mismas r.p.m.

Tras terminar el proceso de centrifugación, se procede a eliminar el sobrenadante, hasta quedar solamente con las células aisladas. Se añaden unos 2 µG de cada uno de los plásmidos con el cDNA a estudiar, los cuales transformarán las células, y añadimos 0,5 mL de tampón 4000 PoliEtilenGlicol 40%/0.1 M ACLI/10mMTris-ClH pH 7.5/1mM EDTA. Se agita nuevamente y se incuban las muestras durante 24 horas a 28°C. Transcurrido este tiempo, se centrifuga la muestra nuevamente 5 minutos a 4000 r.p.m., se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células para poder pasarlas a placas Petri y cultivarlas en un medio selectivo (SD-U+K+ o SD-U-T+K+). Ya que los plásmidos contienen marcadores de síntesis de Uracilo y Triptófano, las células que no

hayan sido transformadas no podrán crecer en estos medios, pudiendo así seleccionar las células de interés.

3.5. Crecimiento de las levaduras en cultivo líquido

Para poder medir el crecimiento de la levadura en cultivo líquido, se determinó su densidad óptica en un espectrofotómetro de absorción visible a 550 nm, en distintos tiempos. Siendo el blanco agua destilada esterilizada.

Se procuró agitar bien la muestra antes de medir, para evitar que las células de levadura sedimentaran en el fondo de la cubeta. El volumen utilizado para medir la densidad óptica en la alícuota fue siempre de 1 mL.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de cepas de levadura para el estudio de la complementación funcional

El primer paso para comprobar la complementación funcional, fue obtener las cepas de levaduras transformadas con los cDNAs de AtHAK5 silvestre y sus versiones delecionadas y con CIPK23 y CBL1. Para ello, se utilizó la cepa 9.3 que carece de los sistemas endógenos de K^+ , TRK1 y TRK2 (Gaber et al., 1988; Ramos et al., 1994). Dicha levadura fue transformada con los plásmidos descritos anteriormente, tal como se explicó en el apartado Materiales y Métodos. Los plásmidos contenían los siguientes cDNAs:

- Sin cDNA, plásmido vacío.
- AtHAK5 silvestre.
- 1° Deleción AtHAK5.
- 2° Deleción AtHAK5.
- 3° Deleción AtHAK5.
- 4° Deleción AtHAK5.
- 5° Deleción AtHAK5.

El medio utilizado para la selección de las levaduras mutadas, fue SD sin uracilo y con 100 mM de K^+ . Dicho medio carecía de uracilo puesto que es el gen marcador del plásmido pDR195. Se crece la levadura de forma rutinaria en presencia de 100 mM de K^+ y se lleva a cabo su transformación con los cDNAs de estudio. Tras obtener varias colonias en medio carente de uracilo, se seleccionaron dos de cada construcción para continuar con el estudio.

Las levaduras seleccionadas anteriormente, se transformaron con un segundo plásmido basado en pGPD414, que contenía los siguientes cDNAs:

- Sin cDNA vacío.
- CIPK23/ CBL1.

Finalmente se seleccionó una colonia de cada construcción en medio sin uracilo y sin triptófano (este último es el marcador del plásmido pGPD414). En la siguiente tabla (Tabla 6) se describen todas las cepas de levadura que se utilizaron en el estudio. En la Figura 10 se muestra la posición dentro la proteína donde empieza cada una de las deleciones.

Tabla 6. Cepas utilizadas en este estudio con sus cDNA que contienen sus plásmidos correspondientes.

CEPA	PLASMIDOS
9.3	pDR195 vacío, pGPD414 vacío
AtHAK5, pDR195	pDR195 con AtHAK5 silvestre, pGPD414 vacío
AtHAK5, CIPK23/CBL1	pDR195 con AtHAK5 silvestre, pGPD414 con CIPK23 y CBL1
1D	pDR195 con 1º Delección AtHAK5, pGPD414 vacío
1D CIPK23 CBL1	pDR195 con 1º Delección AtHAK5, pGPD414 con CIPK23/CEBL1
2D	pDR195 con 2º Delección AtHAK5, pGPD414 vacío
2D CIPK23 CBL1	pDR195 con 2º Delección AtHAK5, pGPD414 con CIPK23/CEBL1
3D	pDR195 con 3º Delección AtHAK5, pGPD414 vacío
3D CIPK23 CBL1	pDR195 con 3º Delección AtHAK5, pGPD414 con CIPK23/CEBL1
4D	pDR195 con 4º Delección AtHAK5, pGPD414 vacío
4D CIPK23 CBL1	pDR195 con 4º Delección AtHAK5, pGPD414 con CIPK23/CEBL1
5D	pDR195 con 5º Delección AtHAK5, pGPD414 vacío
5D CIPK23 CBL1	pDR195 con 5º Delección AtHAK5, pGPD414 con CIPK23/CEBL1

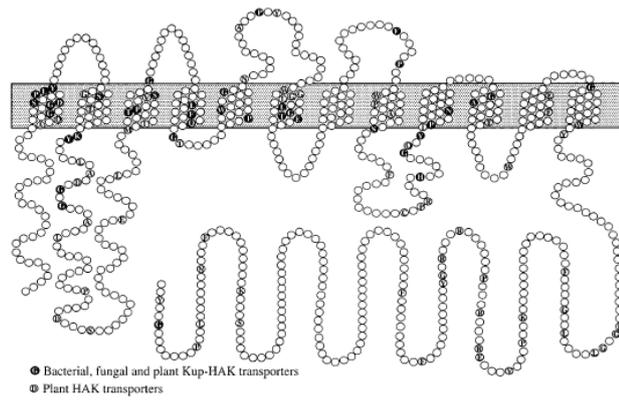


Figura 10. Modelo de estructura secundaria deducida para el transportador AtHAK5. Se observan 12 segmentos transmembrana unidos por lazos citoplasmicos o externos y un último extremo C-Terminal localizado en la cara citoplasmica (Rubio y col., 2000).

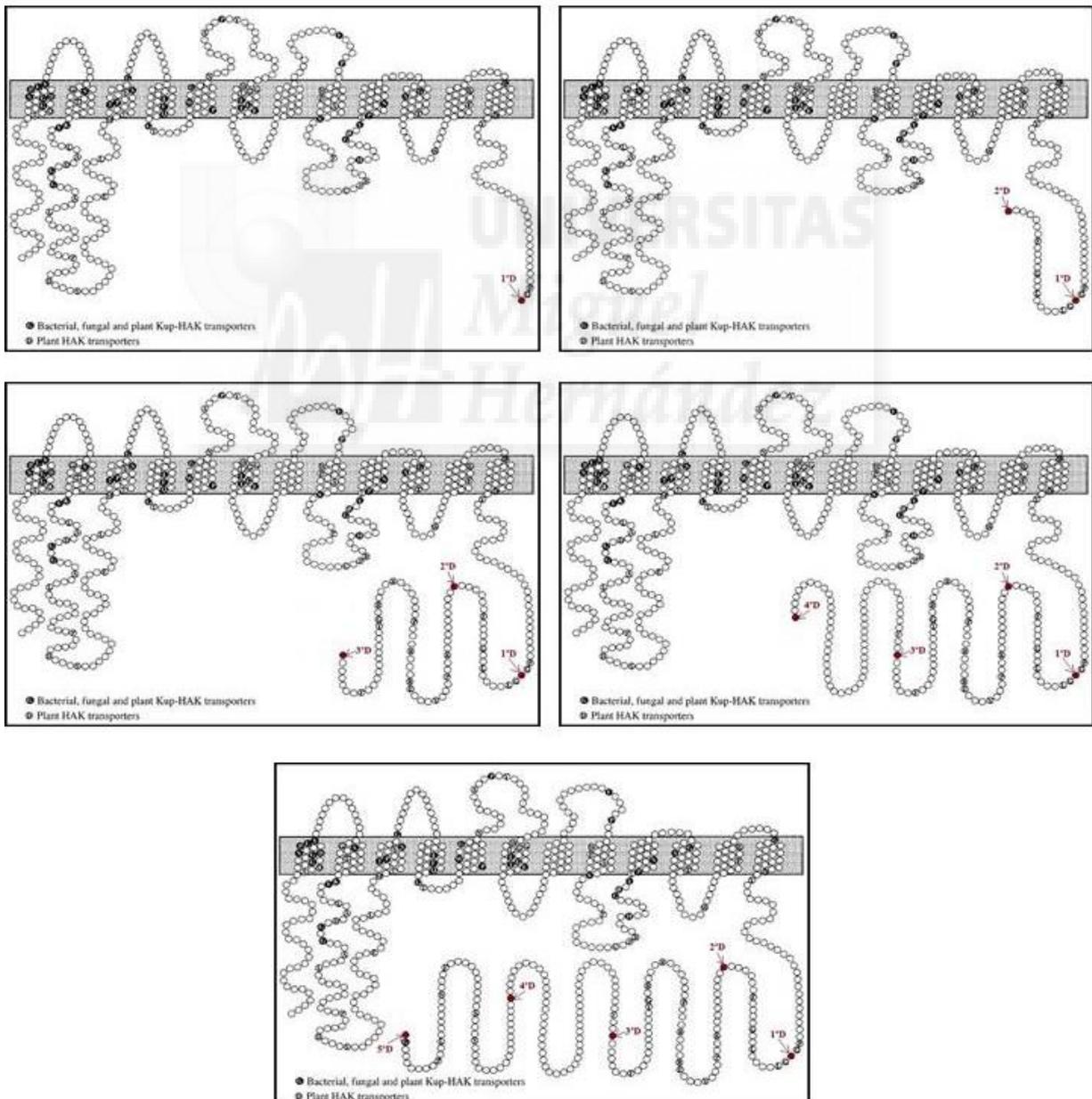


Figura 11. Modelo de estructura secundaria deducida para el transportador AtHAK5. Se observan 12 segmentos transmembrana unidos por lazos citoplasmicos o externos y un último extremo C-Terminal localizado en la cara citoplasmica (Rubio et al. 2000). En esta figura se observa la posición donde empieza cada delección, siendo; 1D posición 538; 2D posición 570; 3D posición 632; 4D posición 687; 5D posición 743.

4.2. Estudio del crecimiento en medio sólido

El primer estudio de complementación funcional se realizó en un medio sólido fosfato arginina (PA) suplementado con diferentes concentraciones de K^+ (0, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M y 50000 μ M). Para cada ensayo se utilizaron cepas de levadura crecidas la noche anterior en medio SD-U-T+ K^+ . Tomamos un inóculo de cada una obteniendo una suspensión en 200 μ L de agua destilada esterilizada en un micro tubo de 1.5 mL. Seguidamente se recogió una alícuota de cada suspensión y se diluyó 100 veces para medir la concentración celular mediante la determinación de la densidad óptica a 550 nm. Finalmente, se tomó el volumen necesario de la suspensión inicial para poder obtener una segunda suspensión de 1 mL de agua estéril a una densidad óptica de 1. La ecuación utilizada para realizar los cálculos se muestra a continuación:

$$DO_1 \times V_1 = DO_2 \times V_2$$

Dónde:

DO_1 : Densidad óptica de la primera suspensión.

DO_2 : Densidad óptica de la segunda suspensión (incógnita).

V_1 : Volumen de la primera suspensión que se necesita.

V_2 : Volumen final que se busca en la segunda suspensión (1 mL).

Tabla 7. Medidas de la densidad óptica obtenidas en la primera suspensión y el volumen necesario para realizar la segunda.

CEPA	DO ₁ (1:100)	DO ₁	μL en 1 ml (V ₁)
9.3	0.233	23.3	39
AtHAK5, pDR195	0.261	26.1	34
AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.193	19.3	47
1º Delección AtHAK5, pDR195	0.189	18.9	48
1º Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.239	23.9	38
2º Delección AtHAK5, pDR195	0.220	22.0	41
2º Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.178	17.8	51
3º Delección AtHAK5, pDR195	0.192	19.2	47
3º Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.372	37.2	24
4º Delección AtHAK5, pDR195	0.174	17.4	52
4º Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.260	26.0	35
5º Delección AtHAK5, pDR195	0.283	28.3	32
5º Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.174	17.4	52

A partir de la segunda suspensión, con concentración óptica de 1, se realizaron 3 diluciones seriadas –cada una 10 veces más diluida que la anterior (1/1, 1/10, 1/100, 1/1000).

Tras esta operación, se inocularon 10 μL de cada dilución en los medios de cultivo sólidos de fosfato arginina con distintas concentraciones de K^+ (como se indicó anteriormente). Seguidamente se introdujeron a 28°C en una incubadora, observado su crecimiento periódicamente.

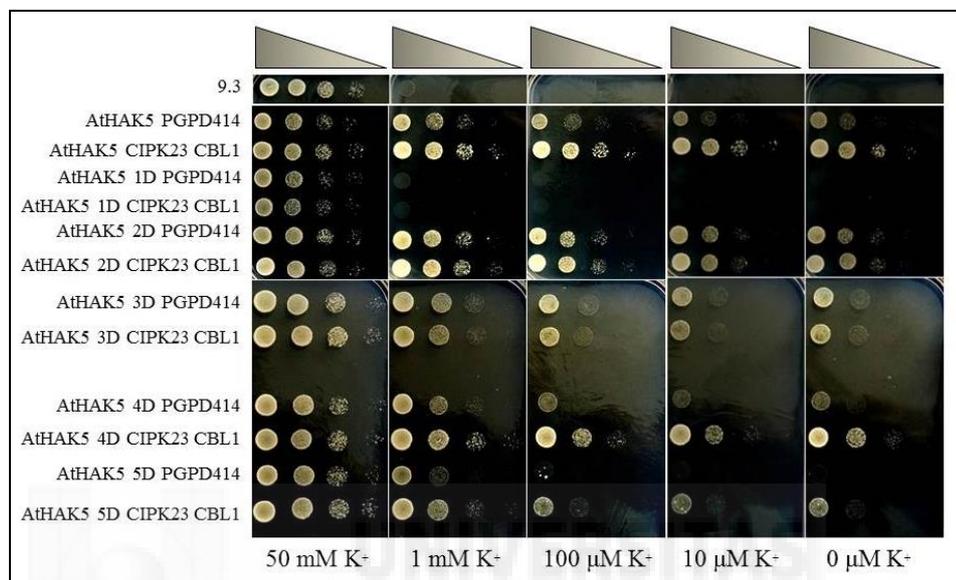


Figura 12. Crecimiento de todas las cepas de levadura transcurridos 4 días de la inoculación. Cepas indicadas en el eje vertical izquierdo, concentración de K^+ del medio indicado en el eje horizontal inferior y diluciones, de menor a mayor, dispuestas en el eje horizontal superior (1/1, 1/10, 1/100, 1/1000).

Como se muestra en la Figura 12 la cepa 9.3 solo crece en el medio con concentración 50 mM de K^+ (control) debido a que la entrada de dicho ion tiene lugar a través de sistemas endógenos distintos de TRK1 y TRK2 (proteínas de transporte de K^+ de alta afinidad). Dichos genes no están presentes en la cepa 9.3, por lo que no es capaz de absorber K^+ a bajas concentraciones.

La cepa que contiene el plásmido pDR195 con HAK silvestre, se desarrolla favorablemente en las diluciones 1/1, 1/10 y 1/100 con concentraciones de K^+ de 50mM y 1mM. Sin embargo, cuando la concentración de K^+ va disminuyendo, el crecimiento se atenúa y solo se muestra en las diluciones de 1/1 y 1/10.

En la cepa con el transportador AtHAK5 junto con el complejo CIPK23/ CBL1, se muestra un buen crecimiento siendo la concentración de K^+ de 50mM. En las demás concentraciones, se puede atisbar crecimiento hasta la dilución 1/100, esto es debido a

que se expresa el complejo de activación CIPK23/ CBL1 el cual eleva la velocidad de crecimiento de las células.

Las cepas AtHAK5 1D pGPD414 y AtHAK5 1D CIPK23/ CBL1 no muestran crecimiento a bajas concentraciones de K^+ , lo que implica que su crecimiento en la placa de 50 mM de K^+ se debe a que el ion entra a través de sistemas endógenos distintos de TRK1 y TRK2. Concluyendo que el extremo C- Terminal de AtHAK5 a partir de la posición del aminoácido 538 posee dominio esencial sobre la funcionalidad del transportador AtHAK5, y que el sistema CIPK23/ CBL1 es incapaz de activarlo.

La cepa AtHAK5 2D pGPD414 presenta un buen crecimiento en todas las placas, incluso en las de baja concentración de K^+ —hasta la dilución 1/100—. Esto podría ser debido a que entre las posiciones 538 y 570 de los aminoácidos en el extremo C- Terminal de AtHAK5, se encuentra una parte fundamental que regula la actividad de AtHAK5, y que además el complejo CIPK23/ CBL1 activa levemente el crecimiento.

En la cepa AtHAK5 3D pGPD414 se observa una velocidad de crecimiento óptima en los medios con baja concentración de K^+ , sin embargo disminuye en comparación con la cepa AtHAK5 2D pGPD414. Y al igual que ocurría anteriormente, no se muestra ninguna diferencia en la velocidad de crecimiento cuando está presente el complejo CIPK23/ CBL1.

En el caso de la cepa AtHAK5 4D pGPD414, la velocidad de crecimiento a bajas concentraciones de K^+ es prácticamente nula, puesto que solo se observa crecimiento en la dilución 1/1. Sin embargo, al contrario de como ocurría anteriormente, en la cepa AtHAK5 4D con CIPK23/ CBL1 sí aumenta su velocidad de crecimiento hasta la dilución 1/100. Por lo que el sistema CIPK23/ CBL1 es capaz de activar los transportadores que existan hasta la posición 687 del extremo C- Terminal de AtHAK5.

Finalmente, en la cepa AtHAK5 5D pGPD414 no se muestra crecimiento a bajas concentraciones de K^+ . Pero en la cepa AtHAK5 5D con CIPK23/ CBL1 se observa un ligero crecimiento en la dilución 1/1 a bajas concentraciones de K^+ .

4.3. Estudio del crecimiento en medio líquido

Para realizar un estudio cuantitativo del crecimiento de las cepas, se llevó a cabo un experimento de crecimiento de levaduras en medio líquido de fosfato arginina (PA), determinándose así el crecimiento de las mismas en distintos tiempos. Además, con dichos datos se pudo obtener la velocidad de crecimiento de cada muestra de levadura.

El primer paso fue cultivar las cepas en medio sólido SD-U-T+K⁺ durante 24 horas para asegurarnos de que estaban frescas. Después, a partir de estos cultivos obtuvimos suspensiones en agua estéril que utilizamos para inocular el medio fosfato de arginina líquido con dos concentraciones distintas de K⁺. La primera concentración la utilizaríamos como control debido a la alta concentración de K⁺ (50 mM), donde todas las muestras deberían crecer sin ningún problema, puesto que el K⁺ entraría por los sistemas endógenos de la levadura, independientes de AtHAK5. La segunda concentración sería de 100 μM K⁺ y en la que se podría estudiar la capacidad de transportar K⁺ de AtHAK5.

Se siguió un procedimiento similar al descrito anteriormente para inocular el medio fosfato de arginina líquido. El inóculo se hizo en 1 mL de agua destilada esterilizada dentro de la cabina de flujo laminar. Posteriormente, se realizó una dilución 1:100 para poder inocular las cepas en un micro tubo y determinar su densidad óptica (DO). Y para homogeneizar la densidad óptica a 0.01, se ajustaron los volúmenes del inóculo que había que añadir a 25 mL de medio de PA. La primera medida de densidad óptica se estableció como tiempo cero en la curva de crecimiento celular. La expresión para calcular el volumen necesario para realizar los inóculos viene reflejada a continuación.

$$DO_1 \times V_1 = DO_2 \times V_2$$

Dónde:

DO₁: Densidad óptica de la primera suspensión.

DO₂: Densidad óptica que se busca en el medio de cultivo líquido (incógnita).

V₁: Volumen que se busca tomar en la primera suspensión.

V₂: Volumen de medio de cultivo utilizado en el estudio (25 mL).

Tabla 8. Medidas de la densidad óptica obtenidas en la primera suspensión y el volumen necesario para realizar la segunda.

CEPA	DO ₁ (1:100)	DO ₁	μL en 1 ml (V ₁)
9.3	0.047	4.7	53
AtHAK5, pDR195	0.056	5.6	45
AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.052	5.2	48
1° Delección AtHAK5, pDR195	0.039	3.9	64
1° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.060	6.0	42
2° Delección AtHAK5, pDR195	0.043	4.3	58
2° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.042	4.2	59
3° Delección AtHAK5, pDR195	0.045	4.5	55
3° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.053	5.3	47
4° Delección AtHAK5, pDR195	0.062	6.2	40
4° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.091	9.1	27
5° Delección AtHAK5, pDR195	0.039	3.9	64
5° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0.056	5.6	45

Los cultivos líquidos se incubaron a 28°C durante una semana a 150 r.p.m de agitación. Cada día se tomaron muestras para medir su densidad óptica, homogeneizando antes con un agitador para evitar que las células sedimentaran. Trabajamos siempre en esterilidad con todos los materiales previamente esterilizados en autoclave y se midió la DO en el espectrofotómetro.

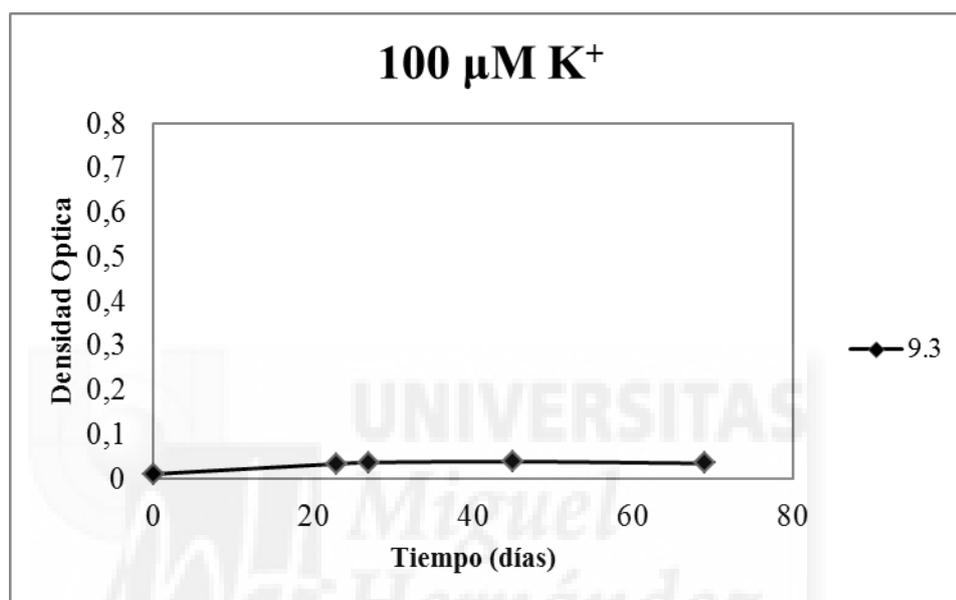


Figura 13. Curva de crecimiento de la cepa 9.3 en una concentración de K⁺ de 100 μM.

En las gráficas podemos diferenciar tres fases; en la primera las células crecen a una velocidad muy baja, esta fase se encuentra hasta las 20 horas aproximadamente y se denomina fase de latencia; a partir de las 20 horas las células comienzan a crecer más rápido, correspondiéndose con la fase de crecimiento exponencial, donde la velocidad de crecimiento celular es máxima; en la tercera fase o fase estacionaria, a partir de las 45 horas, las células son incapaces de crecer más si no se adiciona más medio.

La cepa 9.3 carece de los genes TRK1 y TRK2, en consecuencia no es capaz de incorporar K⁺ en concentraciones externas muy bajas. Por ello, la empleamos como control negativo. La Figura 13 indica que no hay crecimiento a una concentración de 100 μM K⁺.

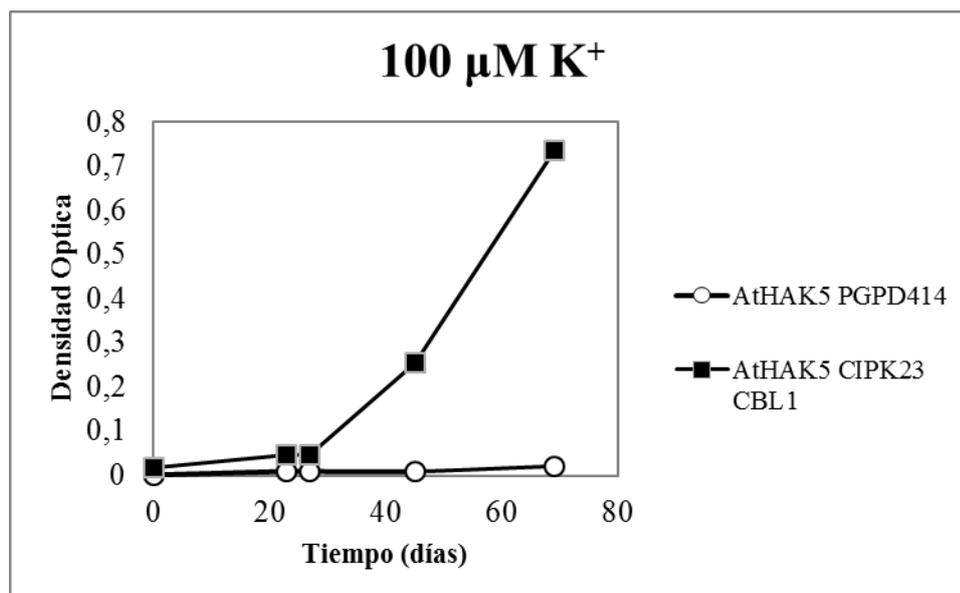


Figura 14. Curva de crecimiento de las cepas AtHAK5 PGPD414 y AtHAK5 CIPK23/CBL1 en una concentración de K⁺ de 100 µM.

El crecimiento de la cepa HAK5 pGPD414, la cual contiene HAK5 silvestre, es muy lento. Es decir, tiene una baja capacidad para absorber el K⁺ debido principalmente a que carece de la acción activadora que produce el complejo CIPK23/CBL1. Sin embargo, el crecimiento de la cepa HAK5 con CIPK23/CBL1 es mayor, por lo que el complejo de activación ejerce su función aumentando bastante la velocidad de crecimiento de las células (Figura 14).

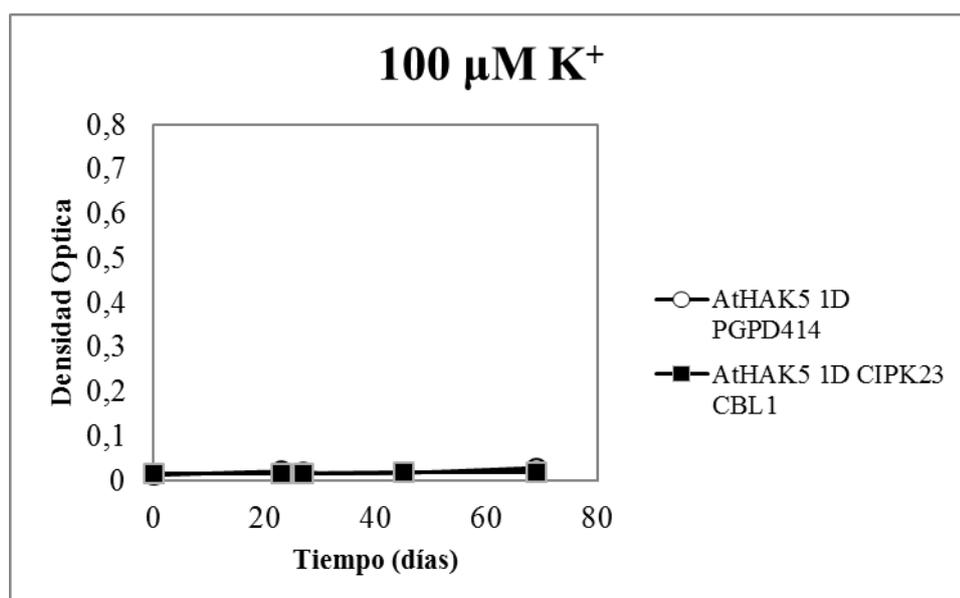


Figura 15. Curva de crecimiento de las cepas AtHAK5 1º Delección PGPD414 y AtHAK5 1º Delección CIPK23/CBL1 en una concentración de K⁺ de 100 µM.

Las cepas AtHAK5 1D pGPD414 y AtHAK5 1D CIPK23/ CBL1 no muestran crecimiento por lo que el extremo C- Terminal de AtHAK5 a partir de la posición del aminoácido 538 posee un dominio esencial sobre la funcionalidad del transportador AtHAK5, y además el sistema CIPK23/ CBL1 es incapaz de activarlo (Figura 15).

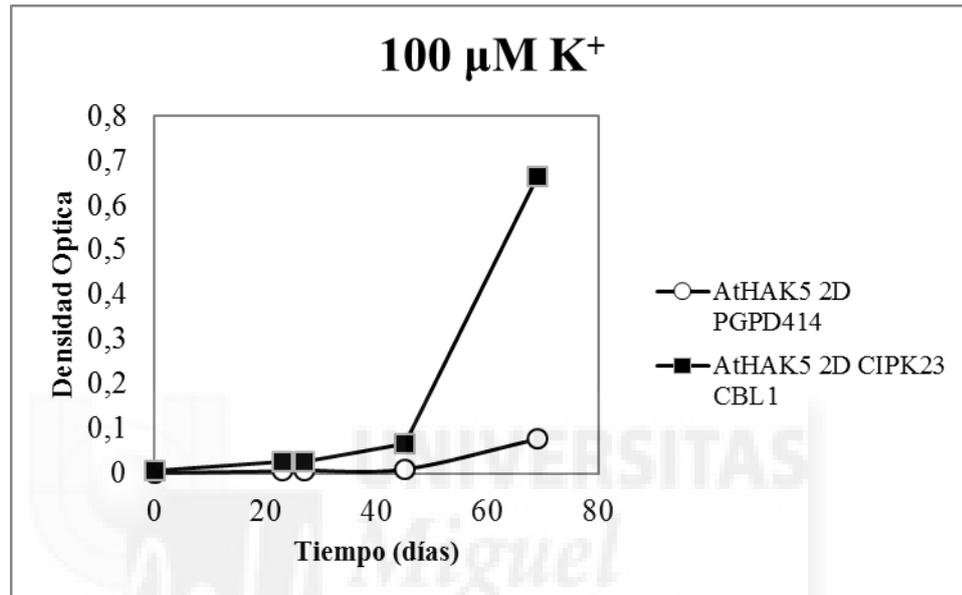


Figura 16. Curva de crecimiento de las cepas AtHAK5 2º Delección PGPD414 y AtHAK5 2º Delección CIPK23/CBL1 en una concentración de K^+ de 100 μM .

Al contrario que en el caso anterior, la cepa HAK5 2D pGPD414 crece progresivamente, sin embargo cuando está presente el complejo CIPK23/ CBL1 la velocidad de crecimiento de las células aumenta considerablemente, como podemos ver en la figura 16.

Aunque el efecto cualitativo es similar al estudiar el crecimiento en placa y en líquido, en este último caso el efecto de CIPK23/ CBL1 es más pronunciado.

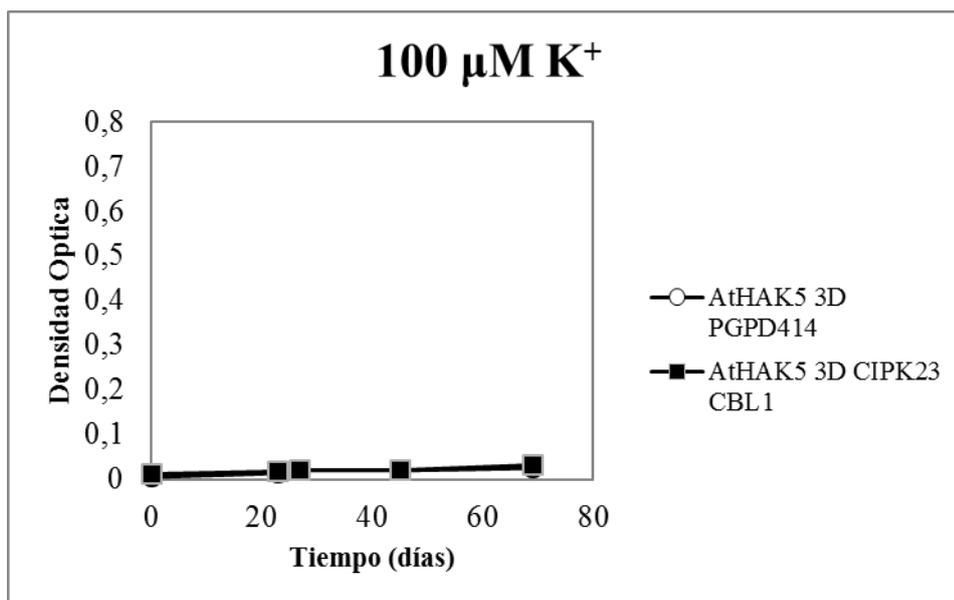


Figura 17. Curva de crecimiento de las cepas AtHAK5 3^o Delección PGPD414 y AtHAK5 3^o Delección CIPK23/CBL1 en una concentración de K⁺ de 100 μM.

La cepa HAK5 con la 3^a delección, no presenta crecimiento ni en presencia ni en ausencia de CPK23/ CBL1. Este hecho es extraño puesto que esta cepa cuenta también con el fragmento presente en la 2^o delección, donde la cepa creció favorablemente en el caso anterior (Figura 17). Es algo que deberá seguirse estudiando.

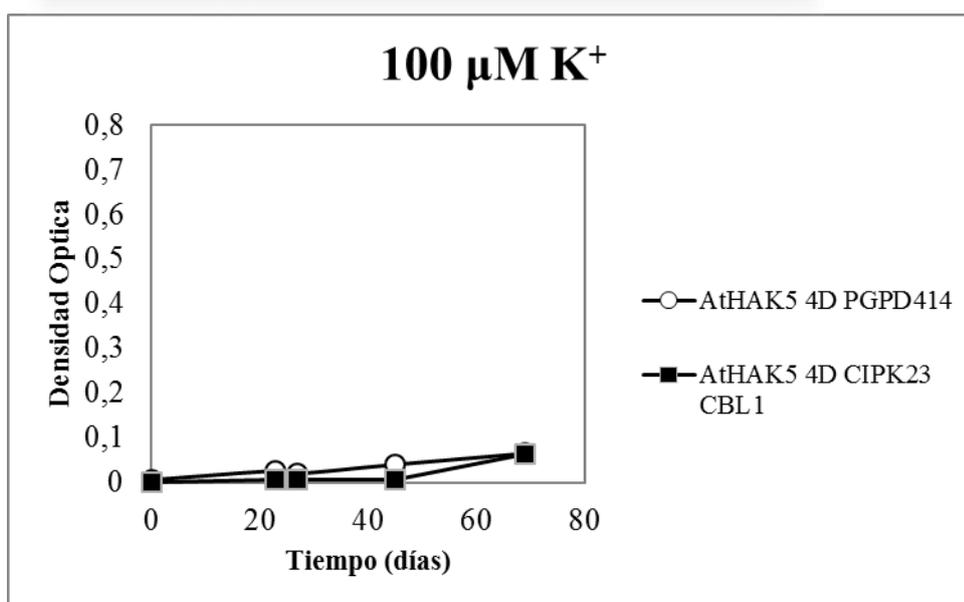


Figura 18. Curva de crecimiento de las cepas AtHAK5 4^o Delección PGPD414 y AtHAK5 4^o Delección CIPK23/CBL1 en una concentración de K⁺ de 100 μM.

El crecimiento de la cepa HAK5 4D pGPD414 no es muy notable, por lo que su velocidad de crecimiento es baja, al igual que si contiene el complejo de activación CIPK23/ CBL1 (Figura 18).

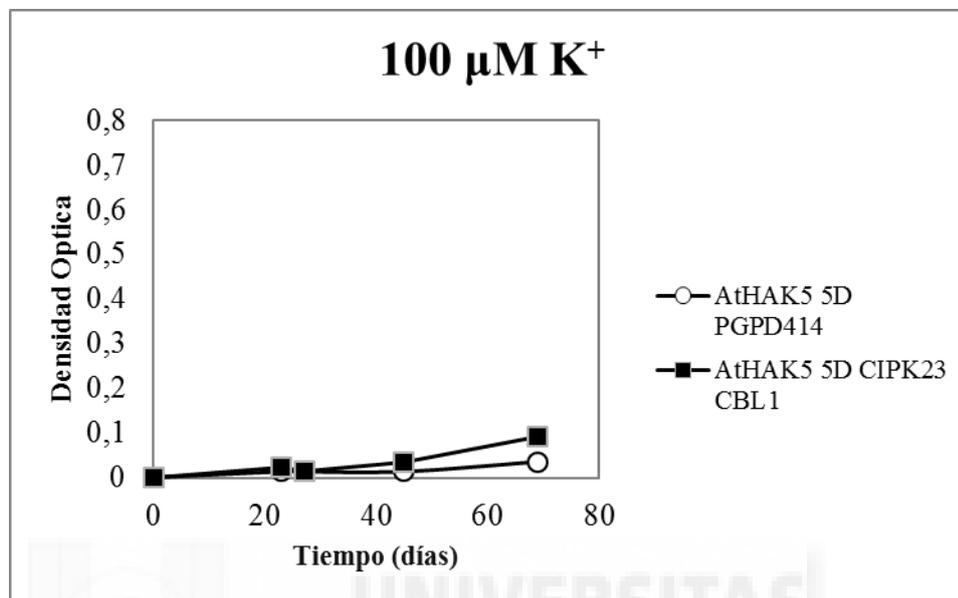


Figura 19. Curva de crecimiento de las cepas AtHAK5 5^o Delección PGPD414 y AtHAK5 5^o Delección CIPK23/CBL1 en una concentración de K⁺ de 100 µM.

Al igual que en el caso anterior, la velocidad de crecimiento de la cepa HAK5 5D con o sin CIPK23/ CBL1 es baja. Siguiendo un patrón muy similar al de la cepa anterior (Figura 19).

Para terminar de caracterizar el crecimiento de cada cepa, los experimentos anteriores se repitieron tres veces y se calcularon las velocidades de crecimiento en la fase exponencial, así como la velocidad específica de crecimiento (Tabla 9 y Figura 9).

Tabla 9. Velocidad de crecimiento de las cepas en su fase exponencial y la velocidad específica de crecimiento.

CEPA	Velocidad (DO/hora) en 100 µM de K ⁺
9.3	0,0000 ± 0,0000
AtHAK5, pDR195	0,0005 ± 0,0025
AtHAK5, CIPK23/CBL1	0,0200 ± 0,0030

1° Delección AtHAK5, pDR195	0,0005 ± 0,0020
1° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0,0000 ± 0,0020
2° Delección AtHAK5, pDR195	0,0028 ± 0,0025
2° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0,0249 ± 0,0030
3° Delección AtHAK5, pDR195	0,0002 ± 0,0025
3° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0,0005 ± 0,0020
4° Delección AtHAK5, pDR195	0,0010 ± 0,0025
4° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0,0023 ± 0,0020
5° Delección AtHAK5, pDR195	0,0009 ± 0,0030
5° Delección AtHAK5, CIPK23/CBL1	0,0024 ± 0,0025

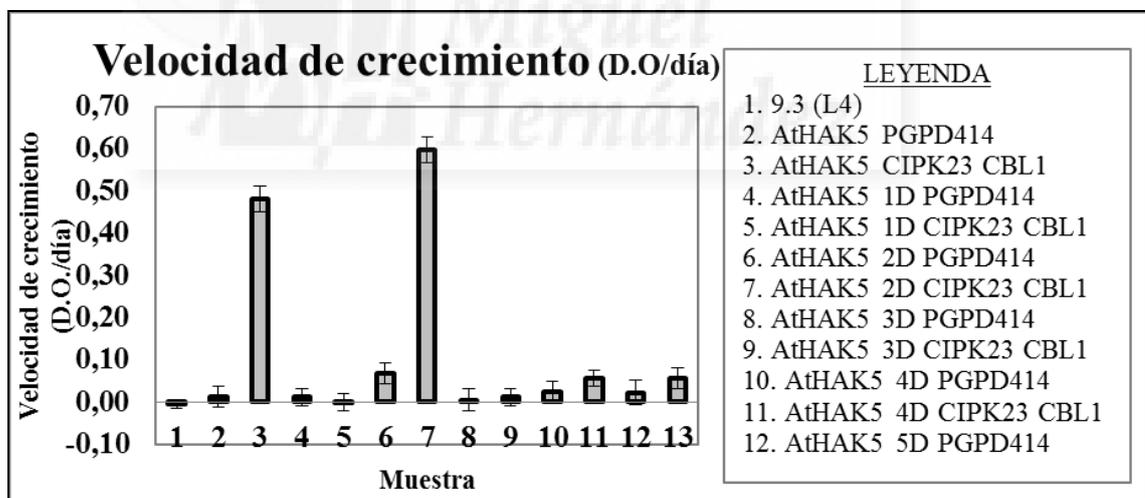


Figura 20. Gráfico de la velocidad específica de crecimiento de las cepas (D.O./ día).

La velocidad máxima de crecimiento está representada en el incremento en la concentración celular de levadura medida como Densidad Óptica, por hora. A continuación, si se observan los datos de velocidades de crecimiento a una concentración de 100 μM de K^+ se puede apreciar cómo las cepas que tienen mayor velocidad de crecimiento son AtHAK5 CIPK23/ CBL1 y AtHAK5 2D CIPK23/ CBL1.

Siendo las que menor velocidad presentan las cepas 9.3 (control), AtHAK5 1D y AtHAK5 3D pGPD414.

El hecho de que la primera deleción de lugar a una pérdida total de la funcionalidad de AtHAK5 puede explicarse porque el largo extremo carboxilo terminal comprende algún dominio funcional que es esencial para que el transportador funcione. Sin embargo, en este momento, es difícil interpretar porqué la segunda deleción da lugar a un transportador funcional mientras que las siguientes deleciones no lo hacen. Una posible explicación es que existan interacciones complejas entre diversos dominios del extremo carboxilo terminal, que sean importantes para regular la función de AtHAK5. Los estudios como este que aquí se presenta permiten plantear interesantes hipótesis sobre dichos dominios que podrán comprobarse en futuros experimentos.



5. CONCLUSIONES

El complejo de regulación CIPK23/ CBL1 aumenta la velocidad de transporte de K^+ a través de HAK5 en cepas que contienen la versión silvestre del transportador, por lo que representa un componente fundamental en cuanto a la absorción de K^+ en plantas silvestres.

Se ha comprobado que las deleciones del extremo C- Terminal de AtHAK5 presentan un efecto importante sobre la funcionalidad del transportador AtHAK5. Dado que no hay estudios anteriores no se puede hacer una comparativa de los resultados, por lo que sería interesante profundizar y realizar más ensayos sobre este extremo C-Terminal y su influencia sobre el transportador AtHAK5.

El complejo de regulación CIPK23/ CBL1 solo ha aumentado la velocidad de crecimiento en la 4° y 5° deleción. En el resto de deleciones no se ha visto ninguna mejora al estar presente dicho complejo. Puede haber ocurrido que se haya alterado la capacidad de interacción del transportador con el complejo regulador, lo que abre una nueva línea de investigación muy interesante sobre los dominios funcionales de AtHAK5.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, S.J., Shin, R., and Schachtman, D.P. (2004).** Expression of KT/KUP Genes in Arabidopsis and the Role of Root Hairs in K⁺ Uptake. *Plant Physiol* 134, 1135-1145.
- Aleman, F., Caballero, F., Ródenas, R., Rivero, R.M., Martínez, V., and Rubio, F. (2014).** The F130S point mutation in the Arabidopsis high-affinity K⁺ transporter AtHAK5 increases K⁺ over Na⁺ and Cs⁺ selectivity and confers Na⁺ and Cs⁺ tolerance to yeast under heterologous expression. *Frontiers in Plant Science* 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00430.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., and Rubio, F. (2009a).** Potassium/sodium steady-state homeostasis in *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana* under long-term salinity conditions. *Plant Science* 176, 768-774.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., and Rubio, F. (2011).** Root K⁺ Acquisition in Plants: The *Arabidopsis thaliana* Model. *Plant and Cell Physiology* 52, 1603-1612.
- Amtmann, A., and Armengaud, P. (2009).** Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 275-283.
- Amtmann, A., Troufflard, S., and Armengaud, P. (2008).** The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiol Plant* 133, 682-691.
- Armengaud, P., Breitling, R., and Amtmann, A. (2004).** The Potassium-Dependent Transcriptome of Arabidopsis Reveals a Prominent Role of Jasmonic Acid in Nutrient Signaling. *Plant Physiol* 136, 2556-2576.
- Bañuelos, M.A., Garciadeblas, B., Cubero, B., and Rodríguez-Navarro, A. (2002).** Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol* 130, 784-795.
- Bañuelos, M.A., Klein, R.D., Alexander, S.J., and Rodríguez-Navarro, A. (1995).** A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J* 14, 3021-3027.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J., and Luan, S. (2007).** Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis. *Plant J* 52, 223-239.

- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Consultada en Junio de 2016. <http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>
- Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., and Leigh, R.A. (2003).** Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 54, 657-661.
- Dobermann, A., Cassman, K.G., Mamaril, C.P., and Sheehy, J.E. (1998).** Management of phosphorus, potassium, and sulfur in intensive, irrigated lowland rice. *Field Crops Research* 56, 113-138.
- Elumalai, R.P., Nagpal, P., and Reed, J.W. (2002).** A Mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 Potassium Transporter Gene Affects Shoot Cell Expansion. *The Plant Cell* 14, 119-131.
- Epstein, E., and Hagen, C.E. (1952).** A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology* 27, 457-474.
- Epstein, E., Rains, D.W., and Elzam, O.E. (1963).** Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 49, 684-692.
- Fedoroff, N.V., Battisti, D.S., Beachy, R.N., Cooper, P.J.M., Fischhoff, D.A., Hodges, C.N., Knauf, V.C., Lobell, D., Mazur, B.J., Molden, D., et al. (2010).** Radically Rethinking Agriculture for the 21st Century. *Science* 327, 833-834.
- Fu, H.H., and Luan, S. (1998).** AtKuP1: a dual-affinity K⁺ transporter from Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 63-73.
- Gaber, R.F., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1988).** TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2848-2859.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z.C., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., and Sutton, M.A. (2008).** Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889-892.
- Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaillet, G., Urbach, S., Ravallec, M., Devauchelle, G., Sentenac, H., and Thibaud, J.B. (1996).** The Baculovirus/Insect Cell System as an Alternative to *Xenopus* Oocytes. FIRST CHARACTERIZATION OF THE AKT1 K⁺ CHANNEL FROM *ARABIDOPSIS THALIANA*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 22863-22870.
- Gierth, M., Maser, P., and Schroeder, J.I. (2005).** The Potassium Transporter AtHAK5 Functions in K⁺ Deprivation-Induced High-Affinity K⁺ Uptake and AKT1 K⁺

Channel Contribution to K⁺ Uptake Kinetics in Arabidopsis Roots. *Plant Physiol* 137, 1105-1114.

Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., and Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58, 2369-2387.

Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., and Sussman, M.R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280, 918-921.

Ju, X.T., Xing, G.X., Chen, X.P., Zhang, S.L., Zhang, L.J., Liu, X.J., Cui, Z.L., Yin, B., Christie, P., Zhu, Z.L., et al. (2009). Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3041-3046.

Jung, J.Y., Shin, R., and Schachtman, D.P. (2009). Ethylene Mediates Response and Tolerance to Potassium Deprivation in Arabidopsis. *The Plant Cell* 21, 607-621.

Kim, E.J., Kwak, J.M., Uozumi, N., and Schroeder, J.I. (1998). AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10, 51-62.

Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S., and Grignon, C. (1996). Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant J* 9, 195-203.

Leigh, R.A., and Jones, R.G.W. (1984). A Hypothesis Relating Critical Potassium Concentrations for Growth to the Distribution and Functions of This Ion in the Plant-Cell. *New Phytologist* 97, 1-13.

Li, L., Kim, B.G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., and Luan, S. (2006). A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 12625-12630.

Luan, S., Lan, W., and Chul Lee, S. (2009). Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL-CIPK network. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 339-346.

Maathuis, F.J.M., and Sanders, D. (1994). Mechanisms of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9272-9276.

Maathuis, F.J.M., and Sanders, D. (1996). Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol Plant* 96, 158-168.

- Maathuis, F.J.M., Sanders, D., and Gradmann, D. (1997).** Kinetics of high-affinity K^+ uptake in plants, derived from K^+ -induced changes in current-voltage relationships - A modelling approach to the analysis of carrier-mediated transport. *Planta* 203, 229-236.
- Mahouachi, J., Socorro, A.R., and Talon, M. (2006).** Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: Growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant and Soil* 281, 137-146.
- Marschner, H. (1995).** Mineral nutrition of higher plants (New York, Springer).
- Maser, P., Gierth, M., and Schroeder, J.I. (2002).** Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and Soil* 247, 43-54.
- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., Sanders, D., et al. (2001).** Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol* 126, 1646-1667.
- Medrano, H., Flexas, J. (2004).** Respuesta de las plantas al estrés hídrico. In *La Ecofisiología Vegetal*, M. Reigosa, Pedrol, N., Sánchez, A., ed. (Thompson).
- Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H., and Appel, T. (2001).** Principles on plant nutrition (Dordrecht, Kluwer).
- Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Martinez, V., and Rubio, F. (2010).** The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K^+ Transporter Is Required for Plant Growth and K^+ Acquisition from Low K^+ Solutions under Saline Conditions. *Mol Plant* 3, 326-333.
- Nieves-Cordones, M., Martinez-Cordero, M.A., Martinez, V., and Rubio, F. (2007).** An NH_4^+ -sensitive component dominates high-affinity K^+ uptake in tomato plants. *Plant Science* 172, 273-280.
- Nieves-Cordones, M., Miller, A., Aleman, F., Martinez, V., and Rubio, F. (2008).** A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Molecular Biology* 68, 521-532.
- Nieves-Cordones, M., Rodenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R.M., Martinez, V., Gaillard, I., and Rubio, F. (2016).** Uneven HAK/KUP/KT protein diversity among angiosperms: species distribution and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00127.
- Philippar, K., Fuchs, I., Luthen, H., Hoth, S., Bauer, C.S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Bottger, M., et al. (1999).** Auxin-induced K^+ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 12186-12191.

Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Cherel, I., and Sentenac, H. (2003). Regulated expression of *Arabidopsis shaker* K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Molecular Biology* 51, 773-787.

Pyo, Y.J., Gierth, M., Schroeder, J.I., and Cho, M.H. (2010). High-Affinity K⁺ Transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 Are Vital for Seedling Establishment and Postgermination Growth under Low-Potassium Conditions. *Plant Physiol* 153, 863-875.

Qi, Z., Hampton, C.R., Shin, R., Barkla, B.J., White, P.J., and Schachtman, D.P. (2008). The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 59, 595-607.

Quintero, F.J., and Blatt, M.R. (1997). A new family of K⁺ transporters from Arabidopsis that are conserved across phyla. *FEBS Lett* 415, 206-211.

Ragel, P., Rodenas, R., Garcia-Martin, E., Andres, Z., Villalta, I., Nieves-Cordones, M., Rivero, R.M., Martinez, V., Pardo, J.M., Quintero, F.J., and Rubio, F. (2015). The CBL-Interacting Protein Kinase CIPK23 Regulates HAK5-Mediated High-Affinity K⁺ Uptake in Arabidopsis Roots. *Plant Physiol* 169, 2863-2873. doi: 10.1104/pp.15.01401.

Ramos, J., Alijo, R., Haro, R., and Rodriguez-Navarro, A. (1994). TRK2 is not a low-affinity transporter in *Saccharomyces cerevisiae* *J Bacteriol* 176, 249-252.

Rengel, Z., and Damon, P.M. (2008). Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. *Physiol Plant* 133, 624-636.

Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1469, 1-30.

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

Rodriguez-Navarro, A., Blatt, M.R., and Slayman, C.L. (1986). A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. *JGenPhysiol* 87, 649-674.

Römheld, V., and Kirkby, E. (2010). Research on potassium in agriculture: needs and prospects. *Plant and Soil* 335, 155-180.

Rubio, F., Alemán, F., Nieves-Cordones, M., and Vicente, M. (2010a). Studies on Arabidopsis athak5, atakt1 double mutants disclose the range of concentrations at which

AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K⁺ uptake. *Physiol Plant* 139, 220-228.

Rubio, F., Arévalo, L., Caballero, F., Botella, M.A., Rubio, J.S., García-Sánchez, F., and Martínez, V. (2010b). Systems involved in K⁺ uptake from diluted solutions in pepper plants as revealed by the use of specific inhibitors. *Journal of Plant Physiology* 167, 1494-1499.

Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., and Martínez, V. (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiol Plant* 134, 598-608.

Santa-María, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., and Rodríguez-Navarro, A. (1997). The HAK1 Gene of Barley is a Member of a Large Gene Family and Encodes a High-Affinity Potassium Transporter. *Plant Cell* 9, 2281-2289.

Schachtman, D.P. (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* 258, 1654-1658.

Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.M., Gaymard, F., and Grignon, C. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256, 663-665.

Sheldrick, R.D., Lavender, R.H., Tewson, V.J., and Cobby, J.M. (1985). The effect on annual dry-matter yield of using a hand-controlled mower or a plot harvester for cutting herbage on small-plot trials. *Grass and Forage Science* 40, 103-107.

Shin, R., and Schachtman, D.P. (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8827-8832.

Spalding, E.P., Hirsch, R.E., Lewis, D.R., Qi, Z., Sussman, M.R., and Lewis, B.D. (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *J Gen Physiol* 113, 909-918.

Troufflard, S., Mullen, W., Larson, T., Graham, I., Crozier, A., and Amtmann, A. (2010). Potassium deficiency induces the biosynthesis of oxylipins and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 10, 172.

Very, A.A., and Sentenac, H. (2002). Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane. *Trends in Plant Science* 7, 168-175.

Very, A.A., and Sentenac, H. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Ann Rev Plant Biol* 54, 575-603.

Walker, D.J., Black, C.R., and Miller, A.J. (1998). The Role of Cytosolic Potassium and pH in the Growth of Barley Roots. *Plant Physiology* 118, 957-964.

Walker, D.J., Leigh, R.A., and Miller, A.J. (1996a). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10510-10514.

Walker, N.A., Sanders, D., and Maathuis, F.J. (1996b). High-affinity potassium uptake in plants. *Science* 273, 977-979.

Wang, Y., and Wu, W.-H. (2010). Plant Sensing and Signaling in Response to K⁺-Deficiency. *Mol Plant* 3, 280-287.

Welch, R.M., and Epstein, E. (1968). Dual Mechanisms of Alkali Cation Absorption by Plant Cells - Their Parallel Operation Across Plasmalemma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61, 447-&.

Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., and Wu, W.H. (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* 125, 1347-1360.

Yang, X.E., Liu, J.X., Wang, W.M., Ye, Z.Q., and Luo, A.C. (2004). Potassium internal use efficiency relative to growth vigor, potassium distribution, and carbohydrate allocation in rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 27, 837-852.

