

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**  
**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y AGROAMBIENTAL**



**Absorción de  $K^+$  en el rango de baja afinidad en  
plantas de tomate. Efecto de deficiencias  
nutricionales de N, P y S**

TRABAJO FIN DE GRADO

SEPTIEMBRE 2015

Autor: Ginés López Gómez

Tutor/es: M<sup>a</sup> Ángeles Botella Marrero

Francisco Rubio Muñoz



## **Absorción de K<sup>+</sup> en el rango de baja afinidad en plantas de tomate. Efecto de deficiencias nutricionales de N, P y S.**

### **Resumen:**

El Trabajo Fin de Grado se centra en el estudio de la absorción de K<sup>+</sup> en el rango de baja afinidad, y el efecto de deficiencias nutricionales de N, P y S sobre dicha absorción, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), de la variedad Microtom, cultivadas en sistema hidropónico bajo condiciones controladas, sometidas a distintos tratamientos de -N, -P y -S. La Absorción de K<sup>+</sup> se ha determinado por desaparición del mismo en la solución nutritiva, en presencia de Cs<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, como inhibidores de los sistemas implicados en la entrada de nutrientes en la planta en el rango de baja afinidad.

**Palabras clave:** absorción de K<sup>+</sup>, baja afinidad, canales LAKT, deficiencias nutricionales, tomate.

**Absorption of K<sup>+</sup> in the range of low-affinity in tomato plants. Effect of nutritional deficiencies of N, P, and S.**

The present work studies the low-affinity K<sup>+</sup> uptake and the effect of nutritional deficiencies (N, P and S) in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), Microtom variety. Plants were grown in hydroponic system under controlled conditions, subjected to different treatments - N, - P, and - S. K<sup>+</sup> uptake was determined by its disappearance in the nutrient solution, in the presence of Cs<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, as inhibitors of K<sup>+</sup> uptake.

**Key words:** K<sup>+</sup> uptake potassium, low-affinity, LAKT channels, nutritional deficiencies, tomato

<b>INDICE:</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>5</b>
1.1. Nutrición de las plantas.	5
1.2. Importancia del K <sup>+</sup> : Funciones.	7
1.3 Homeostasis del K <sup>+</sup> .	9
1.4 Rutas de entrada de K <sup>+</sup> en la planta.	10
1.5 Transporte de K <sup>+</sup> a través de la membrana.	11
1.6 Mecanismos de absorción de K <sup>+</sup> .	14
1.7. Percepción y señalización de la deficiencia nutricional. Interrelación entre distintos nutrientes.	17
<b>2. OBJETIVOS.</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIALES MÉTODOS.</b>	<b>21</b>
3.1. Material vegetal utilizado y condiciones de cultivo.	21
3.2. Desarrollo de los experimentos.	23
3.3. Determinaciones analíticas.	26
3.3.1. Determinación de la composición mineral y del K <sup>+</sup> en la solución nutritiva.	26
3.3.2. Extracción de RNA total y PCR cuantitativa.	26
3.4. Análisis estadístico.	28
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>29</b>
4.1. Desaparición de K <sup>+</sup> .	29
4.2. Efecto del Cs <sup>+</sup> y del Ca <sup>2+</sup> en la absorción de K <sup>+</sup> .	30
4.3 Peso seco de parte aérea y raíz y concentración de K, N, P y S.	32
4.4 Niveles de expresión de <i>LeKT1</i> .	36
4.5 Discusión.	36
<b>5. CONCLUSIONES.</b>	<b>43</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>44</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Nutrición de las plantas

Las necesidades nutricionales de las plantas se estudian de forma separada en dos grandes grupos: nutrientes orgánicos e inorgánicos. Los primeros representan entre el 90 y 95 % del peso seco de las plantas y están constituidos por los elementos carbono, oxígeno e hidrógeno obtenidos a partir del CO<sub>2</sub> de la atmósfera y del agua del suelo. El restante 5-10 %, constituye la denominada fracción mineral, y son los elementos que la planta absorbe en forma iónica del suelo.

El efecto benéfico que produce sobre el crecimiento de las plantas la adición al suelo de elementos minerales, así como el efecto tóxico que productos como la sal ejercen sobre los mismos cultivos son aspectos conocidos en la agricultura desde hace más de 2000 años. Sin embargo, hasta hace 150 años, todavía era materia de controversia científica definir si los elementos minerales cumplían una función de nutriente en el crecimiento de las plantas. A partir de extensas investigaciones sobre composición mineral de diferentes especies de plantas crecidas en distintos suelos, se llegó a la conclusión, a principios del siglo XX, de que ni la presencia ni la concentración de un elemento mineral son criterios de esencialidad (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Las plantas tienen una capacidad limitada para la absorción selectiva de aquellos minerales que no son necesarios para su crecimiento y que pueden llegar a ser tóxicos. En consecuencia, la composición mineral de los diferentes suelos en que crecen las plantas no sirve para establecer si un elemento mineral es esencial o no.

Para que un elemento pueda ser considerado esencial debe cumplir estos tres criterios:

1. Una planta será incapaz de completar su ciclo vital en ausencia del elemento mineral considerado.

2. La función que realice dicho elemento no podrá ser desempeñada por otro mineral de reemplazo o sustitución.
3. El elemento deberá estar directamente implicado en el metabolismo, o deberá ser requerido en una fase metabólica precisa, tal como una reacción enzimática.

En la Tabla 1.1 se muestran los nutrientes esenciales que se dividen en macronutrientes (concentración en el peso seco (PS) de las plantas mayor o igual a 0,1%) y micronutrientes (concentración en el peso seco (PS) de las plantas menor o igual a 0,01%) según su concentración en la planta.

Elemento	Símbolo	Concentración en materia seca ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )
<b>Micronutrientes</b>		
Molibdeno	Mo	0,001
Cobre	Cu	0,10
Zinc	Zn	0,30
Manganeso	Mn	1,0
Hierro	Fe	2,0
Boro	B	2,0
Cloro	Cl	3,0
<b>Macronutrientes</b>		
Azufre	S	30
Fósforo	P	60
Magnesio	Mg	80
Calcio	Ca	125
Potasio	K	250
Nitrógeno	N	1.000
Oxígeno	O	30.000
Carbono	C	40.000
Hidrógeno	H	60.000

**Tabla 1.1.** Elementos esenciales (macronutrientes y micronutrientes) y su concentración en la materia seca.

## 1.2. Importancia del K<sup>+</sup>. Funciones

El K<sup>+</sup> es un componente imprescindible de las células vivas, y todas deben conservar unos niveles adecuados del mismo para crecer y mantenerse con vida. La selección del K<sup>+</sup> en lugar del Na<sup>+</sup> sucedió al principio de la evolución de la vida desde el medio marino y ha sido conservada con muy pocas excepciones incluso en la mayoría de especies halófilas. El continuo aporte de K<sup>+</sup> a la célula desde el medio marino, en el que la concentración de Na<sup>+</sup> es elevada, ha dado forma a los mecanismos de homeostasis iónica. Esto es también aplicable a las especies terrestres, ya que han evolucionado de las marinas que estaban continuamente en el medio marino (Rodríguez-Navarro, 2000; Garcíadeblas et al., 2007).

Las células vegetales siguen el modelo general descrito anteriormente, siendo el K<sup>+</sup> un elemento esencial para las plantas. El K<sup>+</sup> puede suponer hasta el 10 % del peso seco de una planta por lo que es considerado como un macronutriente (Leigh y Jones, 1984). En cuanto a las funciones del K<sup>+</sup> 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 1.1).

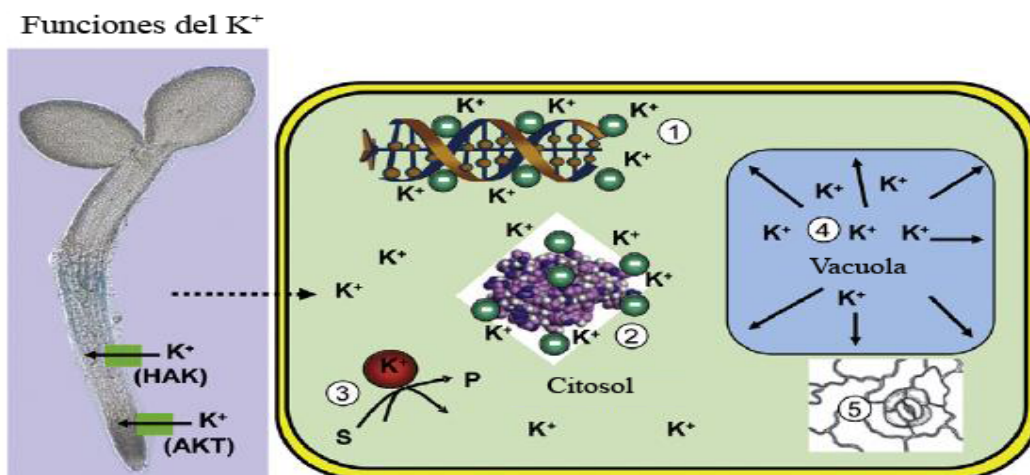
Por otro lado, el mantenimiento general del aparato fotosintético necesita K<sup>+</sup>, y la deficiencia de éste reduce la actividad fotosintética, el contenido de clorofila y la traslocación del carbono fijado (Hartt, 1969; Pier y Berkowitz, 1987).

El K<sup>+</sup> muestra una alta movilidad en las plantas, traslocándose entre raíz y parte aérea por el xilema y el floema, y dentro de la parte aérea de unas hojas a otras (Karley y White, 2009). El K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> (Maathuis y Sanders, 1996; Philippar et al., 1999). La presión osmótica originada por la acumulación de K<sup>+</sup> es también utilizada para conducir la expansión celular y de las hojas (Maathuis y Sanders, 1996; Ruan et al., 2001; Elumalai et al., 2002). El K<sup>+</sup>

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 et al., 2006).

El  $K^+$  es necesario para las reacciones metabólicas por su capacidad de activar numerosas enzimas (Figura 1.1). La unión del  $K^+$  a las enzimas es muy selectiva por el  $K^+$  y no puede ser sustituida por otros iones similares como el  $Na^+$  o el  $Li^+$ . De entre las enzimas que se activan por  $K^+$  encontramos varias isoformas de la PPasa vacuolar que acumula protones en el lumen de la vacuola. Además, otras enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono como la piruvato quinasa, la fosfofructoquinasa, y la ADP-glucosa almidón sintasa también necesitan  $K^+$  (Marschner, 1995). 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).

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 (Ammann y Armengaud, 2009; Armengaud et al., 2009).



**Figura 1.1.** 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.



Debido al papel vital del  $K^+$  en las células vegetales, las plantas con una deficiencia importante de este nutriente terminan por mostrar una reducción del crecimiento, especialmente de la parte aérea (Amtmann et al., 2004). Las diversas manifestaciones fisiológicas de la deficiencia de  $K^+$ , como la limitada expansión celular, la reducción de la fotosíntesis, y la alteración en la regulación de la transpiración pueden ser fácilmente explicadas por las funciones del  $K^+$  descritas anteriormente, pero en muchos casos es difícil saber cuál de estos procesos celulares dependientes de  $K^+$  es el que está afectado en particular (Amtmann et al., 2004).

### 1.3 Homeostasis del $K^+$

Bioquímicamente, muchos de los enzimas que requieren  $K^+$  necesitan relativamente poca concentración del mismo, entre 10 y 50 mM para su máxima actividad. Otras funciones del  $K^+$  no menos importantes que las anteriores se derivan de su gran movilidad. Así el  $K^+$  es uno de los principales agentes implicados en la regulación de los cambios osmóticos, participando en procesos como la osmorregulación durante la expansión celular, los movimientos estomáticos o los tropismos. El proceso más general que requiere movimiento de  $K^+$  es el crecimiento. En otros casos, el simple movimiento del  $K^+$  a través de una membrana, proporciona el movimiento de carga necesario para equilibrar eléctricamente el movimiento de otros iones. Así el transporte de azúcares, aminoácidos, y nitrato puede estar acompañado del flujo de  $K^+$  (Marchner, 1995). Para la realización de todas estas funciones, la concentración de  $K^+$  óptima en el citoplasma se encuentra en el rango de 100 mM (Jones, 1983) y se mantiene constante entorno a ese valor (Walker et al., 1996). Esta concentración de  $K^+$  en el interior de las células contrasta con las diferentes concentraciones encontradas en las soluciones del suelo, que varían desde 10  $\mu$ M a 10 mM. Para poder desarrollarse en condiciones ambientales tan diversas, las plantas disponen de diversos mecanismos que aseguran el suministro y la homeostasis de  $K^+$ .

La deficiencia de  $K^+$  provoca cambios importantes en el desarrollo de la planta como por ejemplo reducción del crecimiento, especialmente en la parte

aérea, modificaciones a nivel fisiológico tales como limitación de la expansión celular y reducción de la fotosíntesis. Cuando el  $K^+$  es limitante, la traslocación de éste desde las hojas maduras y los tallos se activa, y bajo condiciones severas de deficiencia, estos órganos llegan a volverse cloróticos y con el tiempo se necrosan. Las plantas deficientes de  $K^+$  son más susceptibles a estreses abióticos y bióticos como el déficit hídrico, el frío, la salinidad o el ataque por hongos (Marchner, 1995).

### 1.4 Rutas de entrada de $K^+$ en la planta

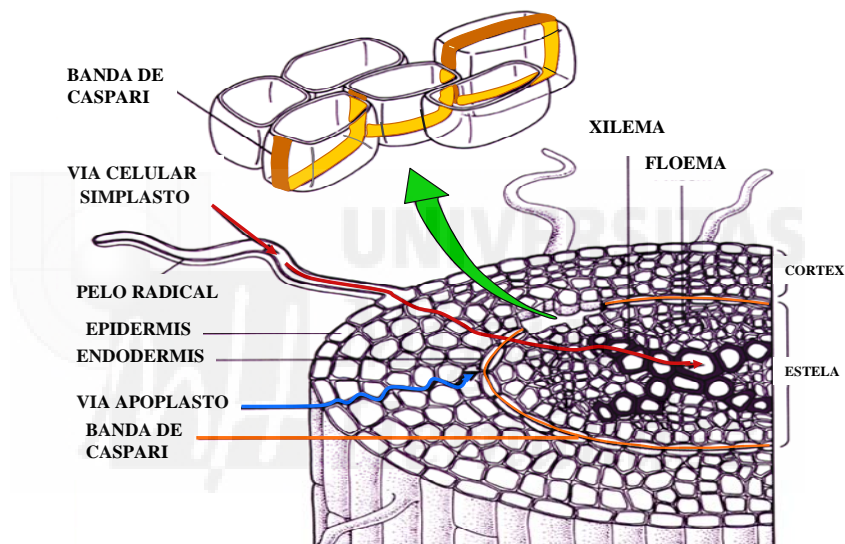
La absorción de  $K^+$  por la raíz se produce a través de células epidérmicas especializadas y de los pelos radicales, que aumentan la superficie de contacto con la solución del suelo, así como a través de las células del córtex. Una vez que el  $K^+$  ha alcanzado la superficie de la raíz, éste ha de llegar hasta la estela donde se encuentran los vasos xilemáticos y traqueidas. Estos vasos xilemáticos son los encargados del transporte de  $K^+$  hacia la parte aérea.

Para llegar a la estela, el  $K^+$  atraviesa los tejidos de la raíz camino del xilema por dos posibles rutas paralelas (Figura 1.2). 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, espacios intercelulares y el lumen de las células muertas (traqueidas y vasos).

Esta ruta quedaría impedida al llegar a la endodermis, debido a la presencia de 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. Así, la ruta del apoplasto se interrumpe en la endodermis y el agua y los elementos minerales se deben incorporar en este punto al simplasto, para poder continuar su transporte hasta el xilema. La otra ruta es la denominada ruta simplástica, que se denomina así porque transcurre por el simplasto, es decir, el continuum del citoplasma

interconectado por plasmodesmos. En su paso por el simplasto los iones pueden ser acumulados en las vacuolas.

Tanto el  $K^+$  que entra por la vía del simplasto como el que lo hace por el apoplasto tiene que atravesar una membrana plasmática para llegar a la corriente xilemática. El  $K^+$  que entra vía apoplasto se puede incorporar al simplasto en cualquier célula del córtex y si no, finalmente lo hará en la endodermis, debido a la banda de Caspary, una barrera que sólo puede salvar atravesando la membrana plasmática de las células endodérmicas, introduciéndose así en el simplasto y vía plasmodesmos llegará al xilema.



**Figura 1.2.** Rutas de entrada de los nutrientes en la raíz. Los nutrientes entran en la raíz siguiendo los espacios intercelulares por la vía del apoplasto o atravesando una membrana plasmática y entrando en el simplasto. Para llegar al xilema, los nutrientes deben entrar en el simplasto en las células de la epidermis, del córtex, o en la endodermis, ya que la banda de Caspary impide la vía apoplástica.

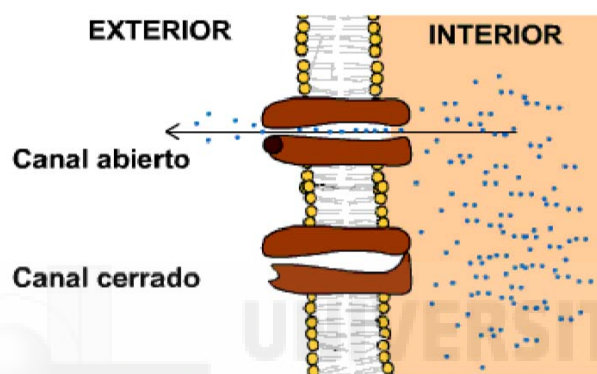
### 1.5 Transporte de $K^+$ a través de la membrana

Tanto la absorción del  $K^+$  desde la solución del suelo hasta el xilema como su homeostasis celular y tisular dependen directamente de la presencia de transportadores de  $K^+$  en las distintas membranas celulares.

Todas las membranas celulares tienen el mismo modelo básico de organización y son estructuras formadas por una doble capa de lípidos atravesada por proteínas. La bicapa lipídica es prácticamente impermeable a

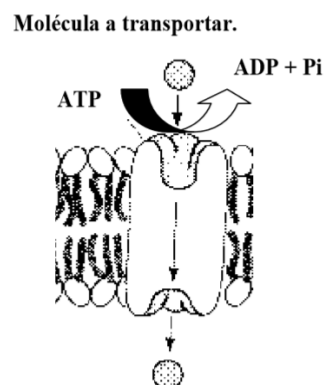
iones, agua y a la mayoría de las moléculas polares. Muchas de las proteínas presentes en las membranas celulares actúan como transportadores para permitir el paso de estas sustancias a través de las membranas.

Existen dos tipos de transportadores: los canales y los transportadores propiamente dichos. Los canales son proteínas transmembrana que funcionan como poros selectivos permitiendo la entrada o la salida de solutos en la célula (Figura 1.3). El tamaño de poro y la densidad de las cargas que revisten el interior del mismo determinan la especificidad del canal.



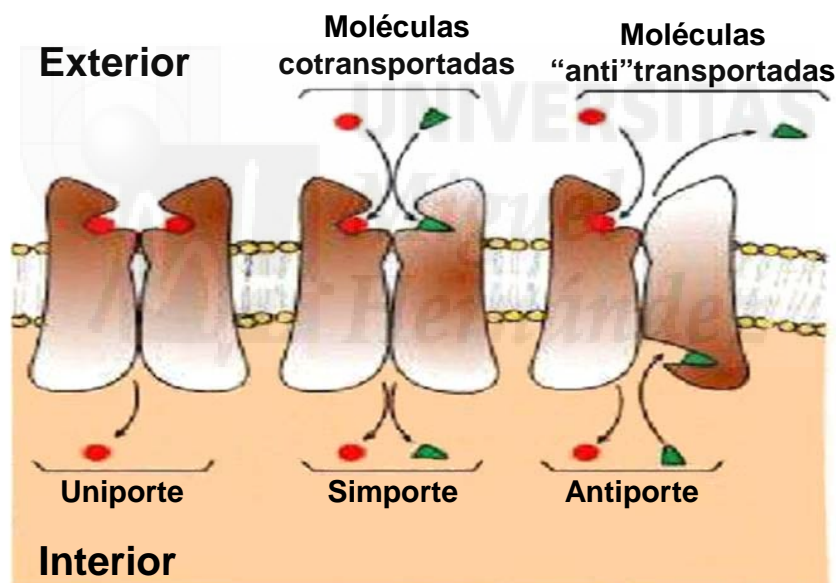
**Figura 1.3.** Esquema de un canal en la membrana. El soluto se mueve a través del poro del canal. La selectividad del canal está determinada por las características del poro.

Los transportadores son proteínas integradas en la membrana que permiten el paso de los solutos mediante la unión de los mismos a un sitio activo de la proteína que provoca un cambio de conformación de ésta, dando lugar al paso del soluto al otro lado de la membrana (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Esquema de un transportador primario. La energía que se libera de la hidrólisis del ATP es empleada para mover la molécula a transportar en contra de su gradiente electroquímico.

En las células vegetales, como en todas las células eucariotas con pared celular, la membrana queda energizada por la bomba de  $H^+$  que es un transportador de tipo primario que acopla directamente la energía desprendida de la hidrólisis del ATP al movimiento de los protones. Esta bomba crea un gradiente de potencial eléctrico y de pH. Este gradiente es utilizado por transportadores de tipo secundario como canales y transportadores propiamente dichos para permitir el paso de iones en contra de su gradiente de concentración. En algunos casos, el movimiento del  $H^+$  a favor de su gradiente electroquímico se acopla al movimiento del soluto en contra de su gradiente electroquímico. Este tipo de transporte puede ser un simporte o un antiporte (Figura 1.5). Se denomina simporte al transportador que cataliza el flujo de solutos en el mismo sentido que el flujo del  $H^+$ . En el antiporte, el  $H^+$  se mueve en sentido contrario al del soluto (Maathuis y Sanders, 1993).



**Figura 1.5.** Esquema de transportadores de tipo secundario. En las células vegetales, el gradiente electroquímico del  $H^+$  (triángulo verde) es utilizado para mover un soluto (círculo rojo) en contra de su gradiente electroquímico. En el uniporte, el gradiente eléctrico permite el paso de un soluto cargado en contra de su gradiente de concentración. En el simporte, el soluto se mueve en contra de su gradiente electroquímico gracias al movimiento del protón en el mismo sentido, y en el antiporte el movimiento del soluto y el protón tienen lugar en sentidos contrarios.

## 1.6 Mecanismos de absorción de $K^+$

En la década de los 50 Epstein propuso considerar los transportadores 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 del  $K^+$ , se 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 (Figura 1.6) (Epstein et al. 1963). Estos estudios pusieron de manifiesto que al menos hay dos tipos de transportadores de  $K^+$  implicados en la absorción del mismo. El primero es un sistema de alta afinidad que opera en el rango de concentración de  $K^+$  de 0,002 a 0,2 mM. Muestra una  $K_m$  para  $K^+$  de 21  $\mu$ M, se satura a concentraciones de  $K^+$  en el rango micromolar y transporta  $K^+$  hacia el citosol en contra de gradiente electroquímico.

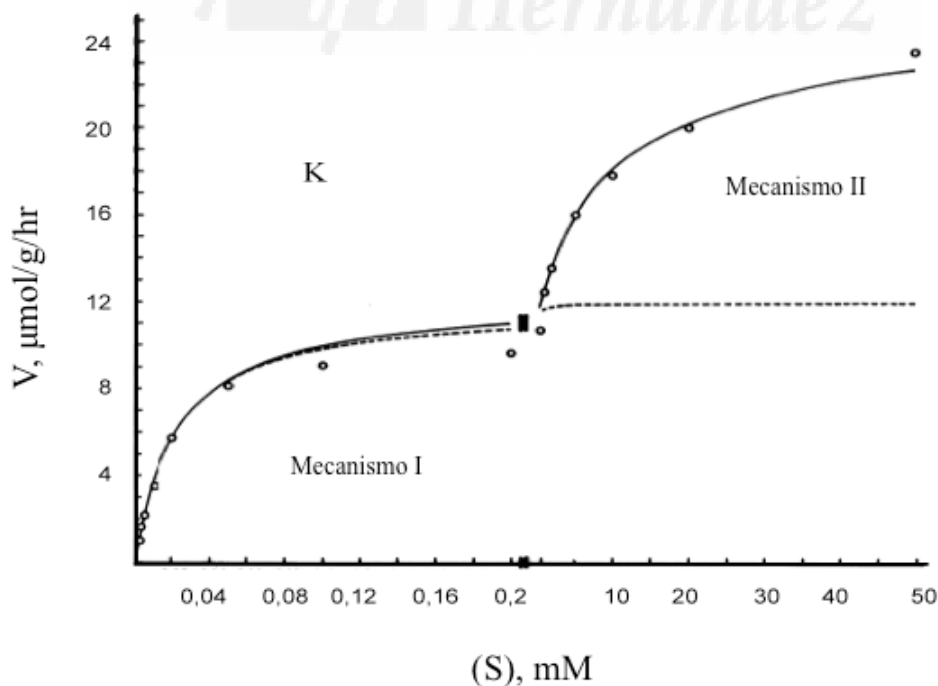
Este sistema de transporte es selectivo para  $K^+$  y  $Rb^+$ , y no se ve afectado por el  $Na^+$ . El segundo es un sistema de baja afinidad, que media la absorción de  $K^+$  a concentraciones altas de este catión, muestra una  $K_m$  para  $K^+$  de 11,4 mM y no es fisiológicamente relevante por debajo de 1 mM. Es un sistema de transporte saturable que no necesita energía, se inhibe por bloqueadores de canales y por  $Na^+$ .

Los dos mecanismos de absorción de  $K^+$  con distintos parámetros cinéticos residen en paralelo en la membrana plasmática. Con estos dos mecanismos la planta se asegura una gran flexibilidad a la hora de absorber  $K^+$ . Tradicionalmente se ha postulado que el sistema de transporte de  $K^+$  de alta afinidad está mediado por un transportador y el sistema de transporte de  $K^+$  de baja afinidad por canales (Maathuis y Sanders, 1994).

Después de la caracterización del sistema de transporte de  $K^+$  de alta afinidad en varias especies vegetales, se puede concluir en general que este sistema se induce por ayuno de  $K^+$ , muestra valores similares de  $K_m$  para todas las especies, se satura en el rango micromolar de concentraciones de  $K^+$  (alrededor de 200  $\mu$ M), no discrimina entre  $K^+$ ,  $Rb^+$  y  $Cs^+$  y se inhibe por  $NH_4^+$

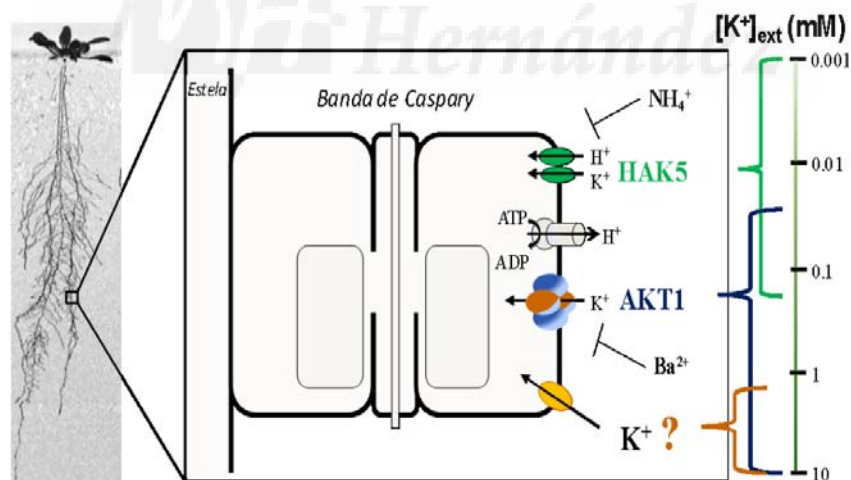
(Kochian y Lucas, 1988; Maathuis y Sanders. 1996; Rodríguez-Navarro, 2000; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006).

Así pues, la absorción de  $K^+$  por las raíces muestra una cinética bifásica con un componente de alta afinidad y otro de baja afinidad (Epstein et al., 1963), mediados posiblemente un simporte  $K^+-H^+$  y un canal respectivamente (Rodríguez-Navarro, 2000; Maathuis y Sanders 1996). Las aproximaciones moleculares han permitido la identificación de familias génicas que codifican sistemas de transporte de  $K^+$  en las plantas (Very y Sentenac, 2003; Maser et al., 2002; Gierth y Maser, 2007), entre las que se encuentran familia de transportadores HAK y la familia de canales Shaker. Estas incluyen el transportador HAK1 (Santa-María et al., 1997), denominado HAK5 en algunas especies como tomate y *Arabidopsis thaliana*, y el canal AKT1 (Sentenac et al., 1992), implicados en la absorción de  $K^+$  en la raíz. En un principio, la función y relevancia de estos sistemas se estableció mediante la expresión de los mismos en sistemas heterólogos y el estudio de los patrones de expresión de los genes que los codifican (Epstein et al., 1963; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Glass, 1978; Lagarde et al., 1996; Schroeder et al., 1994).



**Figura 1.6.** Entrada de  $K^+$  en raíces de cebada. La entrada de  $K^+$  en las raíces de cebada sigue una cinética bifásica con un sistema de alta afinidad o Mecanismo I y un sistema de baja afinidad o Mecanismo II. (Epstein et al., 1963).

La demostración definitiva de la contribución de HAK5 y AKT1 a la absorción de  $K^+$  ha sido posible mediante el empleo de líneas de la planta modelo *Arabidopsis* con mutaciones que anulan la función de estos genes (Pyo et al., 2010; Gierth et al., 2005; Hirsch et al., 1998; Rubio et al., 2010; Rubio et al., 2008; Alemán et al., 2011). En *Arabidopsis* AtHAK5 media un transporte de alta afinidad sensible al  $NH_4^+$  y es el único sistema implicado en la absorción de  $K^+$  a concentraciones inferiores a  $10 \mu M$ . AtAKT1 media un transporte sensible al  $Ba^{2+}$ , que opera fundamentalmente en el rango de la baja afinidad, aunque se solapa con AtHAK5 en la absorción de  $K^+$  a bajas concentraciones. AtHAK5 y AtAKT1 son los únicos sistemas implicados en la absorción de  $K^+$  a concentraciones inferiores a  $200 \mu M$ . Su función es crucial para la nutrición de  $K^+$  porque en plantas mutantes que no tienen estos sistemas, es necesario aumentar la concentración externa de  $K^+$  hasta  $10 mM$  para no observar deficiencias. A estas altas concentraciones, el  $K^+$  puede entrar por sistemas no identificados en la actualidad, que podrían ser canales regulados por nucleótidos cíclicos (Kaplan et al., 2007; Demidchik y Maathuis, 2007; Li et al., 2005) o receptores de glutamato (White, 2010; Dietrich et al., 2010).



**Figura 1.7.** Esquema de los diferentes sistemas de transporte de  $K^+$  en raíces en función de la concentración en el medio exterior.

En general, el modelo anterior puede extenderse a otras especies como tomate o pimiento en las que, al no existir mutantes nulos en los sistemas de transporte, el empleo de los inhibidores específicos  $NH_4^+$  (inhibe el



transportador HAK5) y  $Ba^{2+}$  (inhibe el canal AKT1) permite estudiar su función (Nieves-Cordones et al., 2007; Rubio et al., 2010). Estos estudios sugieren que la contribución específica de cada sistema a la entrada de  $K^+$  puede variar en función de la especie. Así mientras que en *Arabidopsis* AtHAK5 y AtAKT1 contribuyen de forma similar a la entrada de  $K^+$  en un rango de concentraciones de 50-200  $\mu M$ , en tomate y pimiento el componente sensible al  $NH_4^+$ , mediado por LeHAK5 y CaHAK1 respectivamente, domina la entrada de  $K^+$  a bajas concentraciones. Estas observaciones tienen gran importancia porque por una parte ponen de manifiesto la necesidad de los estudios tanto en especies modelo como cultivadas y por otra porque podrían apuntar a un papel fundamental del transportador HAK5 en la nutrición de  $K^+$  en ciertas especies cultivadas.

### **1.7. Percepción y señalización de la deficiencia nutricional.**

#### **Interrelación entre distintos nutrientes**

La percepción y señalización de la deficiencia de un nutriente juega un papel fundamental en la absorción y correcta nutrición del mismo (Amtmann et al., 2006). Se ha observado que los mecanismos de percepción y señalización tienen muchos puntos en común entre los diversos nutrientes (Ho y Tsay 2010; Tsay et al., 2011). Por otra parte, situaciones de estrés abiótico, que comprometen la nutrición mineral, afectan no sólo los propios sistemas de absorción, sino que también inciden sobre los mecanismos de percepción y señalización, alterando la regulación de los sistemas de absorción.

El primer evento que tiene lugar al darse una deficiencia de  $K^+$  es una hiperpolarización del potencial de la membrana plasmática de las células de la epidermis y del córtex de la raíz. Este podría ser el primer punto de la ruta de señalización de la activación del transporte de  $K^+$  a través los transportadores HAK5. En tomate se ha observado una correlación positiva entre la hiperpolarización del potencial de membrana y la expresión del gen *LeHAK5* (Nieves-Cordones et al., 2008), y esto podría ocurrir también en *Arabidopsis* (Alemán et al., 2011). Por otra parte, la deficiencia de  $K^+$  también da lugar a una elevación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los canales de  $Ca^{2+}$

que se activan por hiperpolarización y por ROS permitirían la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y darían lugar a una señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , registrada por diversas proteínas como CDPKs, CaMs o CBLs (White 2010; Xu et al., 2006; Cheong et al., 2007). En concreto se ha observado que cuando el suministro de  $\text{K}^+$  disminuye, el canal AKT1 se activa mediante fosforilación por el complejo CBL1/9-CIPK23. La defosforilación mediante la fosfatasa AIP1 lo inactivaría (Lee et al., 2007). Esta ruta de señalización de  $\text{K}^+$  tiene elementos comunes con las de otros nutrientes. La hiperpolarización del potencial de membrana también se observa en deficiencia de  $\text{NO}_3^-$  (Meharg y Blatt, 1995) y la quinasa CIPK23 también está implicada en la actividad de los sistemas de absorción de  $\text{NO}_3^-$  (Krouk et al., 2010). La deficiencia de N o de P también da lugar a un incremento de ROS (Shin et al., 2005) y se ha observado que el gen *AtHAK5* se induce no sólo por la falta de  $\text{K}^+$  sino también por deficiencia de N, P, (Shin et al., 2005) y Mn (Wei Yang et al., 2008). La reposición de  $\text{NO}_3^-$  reprime la expresión de *LeHAK5* (Wang et al., 2001), y la presencia de  $\text{NH}_4^+$  lo induce (Nieves-Cordones et al., 2008).

A nivel fisiológico se ha descrito tradicionalmente la importancia del  $\text{K}^+$  en la nutrición del N ( $\text{NO}_3^-$ ). El  $\text{K}^+$  permite la circulación del  $\text{NO}_3^-$  en el xilema y su posterior asimilación en la parte aérea (Marschner, 1995) y existe una correlación positiva entre la entrada de  $\text{K}^+$  y  $\text{NO}_3^-$  que se traduce en el aumento de la actividad nitrato reductasa en las hojas de las plantas con suministro extra de  $\text{K}^+$  (Ruffy et al., 1981; Blevins et al., 1978). Además, el  $\text{K}^+$  promueve la incorporación del N en proteínas (Koch y Mengel, 1974; Ruiz y Romero, 2002).

Todo esto sugiere una interrelación en los mecanismos de percepción y señalización de la deficiencia nutricional en las plantas, así como un importante efecto de las condiciones de estrés abiótico como la salinidad sobre dichos mecanismos. Parecen existir elementos comunes en las rutas de señalización y también elementos diferenciales que permiten una respuesta específica a la falta de cada nutriente en particular. Se hace patente, que la presencia de unos nutrientes determinados o la presencia de iones tóxicos como el  $\text{Na}^+$ , no solo inciden sobre las proteínas de transporte implicadas en la absorción de otros nutrientes, sino también en la regulación de las mismas. En definitiva, la

percepción y señalización de la deficiencia de nutrientes y en particular de la de  $K^+$ , aparece como un objetivo importante para el avance del conocimiento de la nutrición mineral y el desarrollo de herramientas para su mejora en las especies cultivadas (Schachtman y Shin, 2007).



## 2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este Trabajo Fin de Grado es estudiar los sistemas implicados en la absorción de  $K^+$  en el rango de la baja afinidad, así como, el estudio del efecto de las deficiencias nutricionales de N, P y S en la absorción de  $K^+$ . Para ello se han utilizado plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), de la variedad Microtom cultivadas en sistema hidropónico bajo condiciones controladas sometidas a distintos tratamientos de -N, -P y -S.

Para desarrollar este objetivo se han estudiado los siguientes parámetros:

1. Efecto de la ausencia de los nutrientes N, P y S sobre la absorción de  $K^+$  en el rango de baja afinidad, determinada por la desaparición de  $K^+$  en la solución nutritiva frente al tiempo.
2. Efecto de la ausencia de los nutrientes N, P y S sobre el crecimiento y composición mineral de las plantas.
3. Absorción de  $K^+$  por desaparición del mismo en la solución nutritiva, en presencia de  $Cs^+$  y  $Ca^{2+}$ , como inhibidores de los sistemas implicados en la entrada de nutrientes en la planta en el rango de baja afinidad.
4. Nivel de expresión del gen *LeKT1*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal utilizado y condiciones de cultivo

El trabajo experimental se ha realizado con plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad Microtom. Las semillas de tomate se pusieron en una solución de  $\text{CaSO}_4$  0,50 mM durante 2 días en oscuridad a 25°C y aireación. La germinación se realizó colocando las semillas en bandejas con vermiculita saturada en solución de  $\text{CaSO}_4$  0,5 mM. Las bandejas se taparon con papel de aluminio, con perforaciones para permitir la aireación de las semillas, a continuación se pusieron en una cámara de germinación en condiciones de oscuridad a 28°C. Todos los días las semillas fueron regadas con agua destilada, para que tuvieran buenas condiciones de humedad que facilitaran la germinación. Cuando las semillas germinaron (2 días), las bandejas se trasladaron a una cámara de cultivo en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad, quitándoles el papel que las cubría y permaneciendo en estas condiciones durante otros 2 días.

Los experimentos realizados en la cámara de cultivo se llevaron a cabo en cultivo hidropónico. A las plántulas provenientes de la germinación, en bandejas con vermiculita (Fotografía 3.1), se le lavaron muy bien las raíces para eliminar la vermiculita y se trasplantaron a barreños de 12,5 litros de capacidad que contenían disolución nutritiva 1/5 Hoagland modificada con aireación permanente, cuya composición se especifica en la Tabla 3.1.



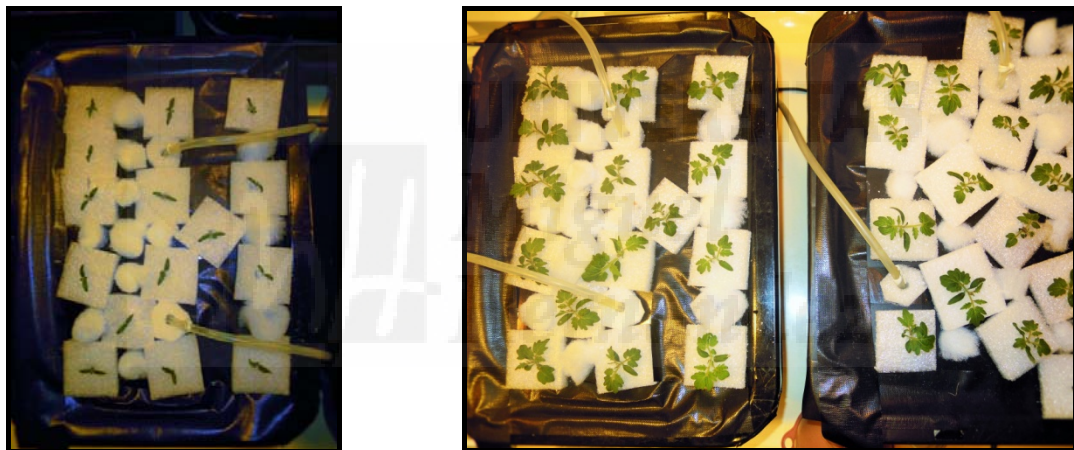
Faltan parámetros necesarios o son incorrectos.

**Fotografía 3.1.** Detalle de la bandeja de germinación antes del trasplante de las plántulas cuando presentaban dos hojas.

Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,4 mM	Fe-EDDHA	10 µM
KCl	1,4 mM	MnSO <sub>4</sub>	1 µM
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,35 mM	ZnSO <sub>4</sub>	1 µM
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	0,1 mM	CuSO <sub>4</sub>	0,5 µM
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	50 µM	NiSO <sub>4</sub>	0,1 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12,5 µM	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,1 µM

Tabla 3.1. Composición de la disolución nutritiva 1/5 Hoagland.

Los barreños disponían de unas tapaderas con unos orificios en los que se colocaban las plántulas ajustándolas con goma-espuma, de forma que no flotaban en la disolución y permitía la aireación entre la propia tapa y la disolución nutritiva (Fotografía 3.2 y Fig. 3.1).



Fotografía 3.2. Detalle del sistema de cultivo en la cámara de cultivo con plantas de dos días de edad y una semana.

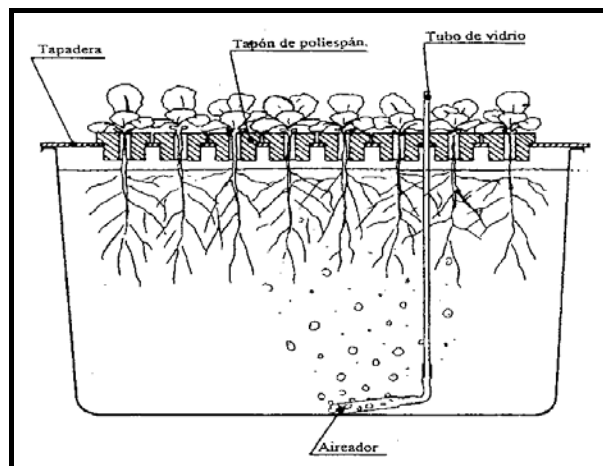


Figura 3.1. Esquema del sistema de cultivo empleado.

Diariamente se ajustaba el pH de la disolución nutritiva a 5,5 con HCl o NaOH 0,5 M. La medida de pH se realizaban con un pH-metro portátil Crison. Además se añadía agua destilada para mantener siempre los 12,5 litros en el barreño. Las disoluciones nutritivas se cambiaban cada 7 días.

Los experimentos se llevaron a cabo en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Durante el día y la noche la temperatura fue de 25/20 °C, con un ciclo de horas de luz 16/8 h, una humedad relativa de 60/80% y una intensidad luminosa de 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 3.2. Desarrollo de los experimentos

Las plantas de tomate estuvieron durante 10 días en la solución nutritiva control 1/5 de Hoagland indicada anteriormente (Tabla 3.1). Un grupo de 9 plantas se tomó como cosecha inicial (C0) y en ellas se determinó el peso seco y la composición mineral. El resto de las plantas fueron sometidas durante 7 días a diferentes tratamientos nutricionales con ausencia de N, P y S (Fotografía 3.3 y Tabla 3.2). Después de este tiempo se realizaron los experimentos de absorción por desaparición de  $\text{K}^+$  en el medio. Posteriormente se determinó en ellas el peso seco y la composición mineral, siendo la cosecha final (C1).



**Fotografía 3.3.** Detalle del desarrollo de plantas de tomate *Microtom* (*Solanum lycopersicum* L.) tras 7 días en los diferentes tratamientos nutricionales.

Tratamiento	K <sup>+</sup> (mM)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	P (mM)	S (mM)
Control	1.4	2.8	0.2	0.35
- N	1.4	0	0.2	0.35
- P	1.4	2.8	0	0.35
- S	1.4	2.8	0.2	0

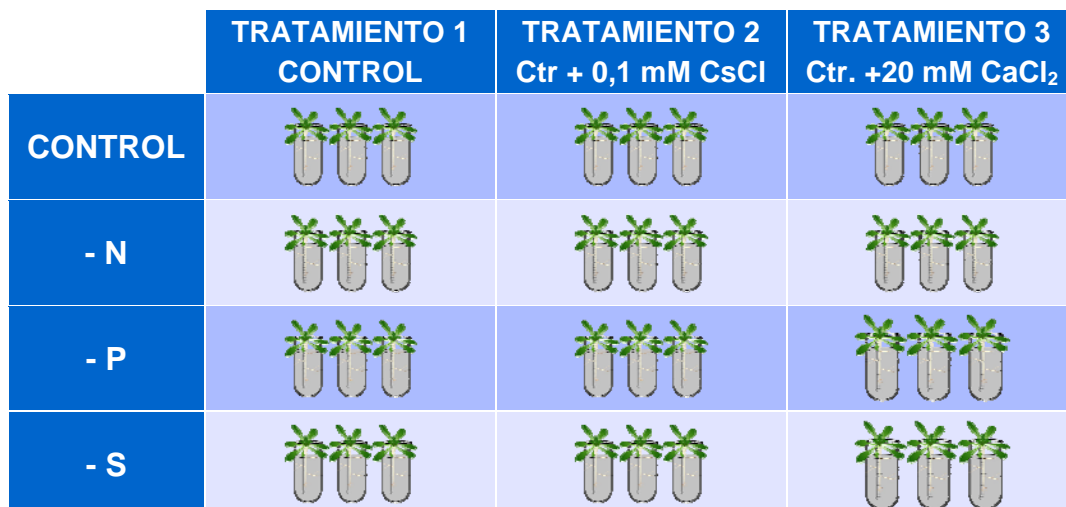
**Tabla 3.2.** Concentraciones de K<sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, P y S en la solución utilizada para los diferentes tratamientos nutricionales.

**Experimentos de desaparición de K<sup>+</sup>**

Las plantas fueron cultivadas en las soluciones indicadas en la Tabla 3.2 durante 7 días. Para los experimentos de absorción de K<sup>+</sup>, se tomaron 3 repeticiones de cada uno de los tratamientos. Las raíces de las plantas fueron lavadas en una solución fría libre de K<sup>+</sup> y posteriormente se transfirieron a tubos de 50 mL que contenían 40 mL de la solución nutritiva con o sin inhibidores de la absorción de K<sup>+</sup> (Cs<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>):

- TRATAMIENTO 1: Control (1/5 Hoagland con 1,4 mM K<sup>+</sup>).
- TRATAMIENTO 2: 1/5 Hoagland (1,4 mM KCl) + 1 mM CsCl
- TRATAMIENTO 3: 1/5 Hoagland (1,4 mM KCl) + 20 mM CaCl<sub>2</sub>

En la Figura 3.2 se representa esquemáticamente el experimento de absorción de K<sup>+</sup>.



**Figura 3.3.** Esquema del experimento de absorción de K<sup>+</sup> con o sin inhibidores.



El experimento tuvo una duración de 9h, tomándose muestras cada 3h para determinar la concentración de  $K^+$  en la solución nutritiva. Se añadía agua bidestilada a los tubos para compensar las pérdidas por transpiración y evaporación. La velocidad de desaparición de  $K^+$  fue calculada a partir de la reducción de la concentración de este elemento en la solución externa por gramo de peso seco de la raíz y unidad de tiempo. Se calculó la velocidad de absorción de  $K^+$  en los tratamientos que contenían  $Cs^+$  o  $Ca^{2+}$  comparándola con la del control, que era el 100%. El experimento se repitió 3 veces, con 3 plantas por tratamiento en cada experimento.



**Fotografía 3.4.** *Detalle del sistema empleado para determinar la absorción de  $K^+$  en el rango de baja afinidad.*

Al finalizar el experimento las plantas se fraccionaron en parte aérea y raíz y se colocaron en bolsas de papel para determinar el peso seco mediante secado en estufa durante 48h a  $65^{\circ}C$ .

### **3.3. Determinaciones analíticas**

#### **3.3.1. Determinación de la composición mineral y de K<sup>+</sup> en la solución nutritiva**

El material vegetal seco se guardó en una estufa a 65 °C para la posterior determinación de la composición mineral. Para la mineralización de la muestra, se realizó una digestión nítrico-perclórica, pesando 0,1 g de material vegetal (molido y tamizado a 0,5 mm Ø) o en su defecto la cantidad de material vegetal obtenida en tubos de digestión y se adicionaron 3 mL de ácido nítrico-perclórico (2:1). Permaneciendo a temperatura ambiente durante toda la noche (12 horas). Posteriormente, se colocaron en un bloque digestor a 90 °C durante 1 hora, tras ello se elevó la temperatura a 120°C durante 4 horas. A continuación se aumentó a 180 °C durante 2 horas y finalmente a 200 °C entre 4 y 6 horas hasta la decoloración de la muestra y volumen final inferior a 0,5 mL. Una vez realizada la digestión de la muestra y después de enfriarse, se enrasó con agua destilada hasta 25 mL en las muestras de 0,1 g de material vegetal y hasta 10 mL cuando la muestra tenía un peso inferior a 0,1 g. Por último, se determinaron las concentraciones de nutrientes en un espectrofotómetro de emisión atómica (Perkin- Elmer modelo ICP 5500).

La determinación de potasio en la solución nutritiva se realizó por espectrofotometría de emisión atómica de llama. Las diluciones correspondientes se hicieron con LaCl<sub>3</sub> 0,1% para evitar interferencias. Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica Solar Unicam 969.

El N- total se determinó mediante el método Kjeldahl, modificado a escala semimicro (Jackson, 1960).

#### **3.3.2. Extracción de RNA total y PCR cuantitativa**

La extracción del RNA de la raíz de plantas de tomate se realizó mediante el RNeasyPlant mini kit de Qiagen (QiagenScience, Maryland, USA ) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pasaron 100 mg de material

vegetal en polvo previamente triturado en un mortero con nitrógeno líquido a un microtubo de 1,5 mL con 450  $\mu$ L de tampón RLT y 4,5  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. Se mezcló varias veces con un agitador y se transfirió la mezcla a las columnas suministradas por el fabricante. Tras centrifugar las columnas, se precipitó el RNA que estaba en el efluente con alcohol etílico y se transfirieron a otras columnas. Tras sucesivas centrifugaciones en presencia de tampones de lavado, se eluyó el RNA de la columna con agua libre de RNAsa hasta un volumen adecuado. Posteriormente, se trató el RNA con DNA-free™ (AppliedBiosystems/Ambion, Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar el DNA presente en las muestras. Seguidamente, se cargaron 2  $\mu$ L de la solución con el RNA en un gel de agarosa (gel y cubeta previamente tratados con SDS al 10%) para comprobar la integridad del ácido nucleico. A continuación, se realizaron PCRs para comprobar la completa eliminación de DNA. La concentración de RNA se determinó mediante un Nanodrop 1000 Spectrophotometer THERMO SCIENTIFIC.

La primera cadena de cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído de las plantas. Para ello se utilizó el kit First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), utilizando Not I-(dT)18 como cebador 3'.

Para llevar a cabo el protocolo de PCR cuantitativa, se empleó el cDNA de cadena sencilla sintetizado como se ha indicado anteriormente.

Las reacciones se llevaron a cabo en un sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando la configuración de ciclos por defecto. La etapa de la curva de disociación se añadió en cada reacción para comprobar que la  $T_m$  de los productos era correcta. Los niveles de expresión se calcularon mediante el método de cuantificación relativa (Livak, Kenneth J. y Schmittgen, Thomas D. 2001). Se añadieron 12,5  $\mu$ L de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) a cada pocillo, más 2  $\mu$ L de cDNA y 10,5  $\mu$ L de cebadores específicos disueltos en agua a una concentración final de 100 nM.

Se prepararon diluciones seriadas de cDNA de cada muestra para comprobar que la eficiencia de las reacciones era  $100 \pm 5 \%$ . Se llevaron a cabo reacciones control en cada carrera para verificar que no tuvo lugar ninguna amplificación inespecífica. Los valores de  $\Delta\Delta C_t$  se transformaron en expresión relativa (aumento en  $n^\circ$  de veces) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Los cebadores se diseñaron con el programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando la configuración por defecto (Temperatura de alineamiento =  $60^\circ\text{C}$ , Longitud del amplicón = 50 pb). Se emplearon los siguientes cebadores:

LeLKT1F 5' TGCCTGCTCGACTCCAAGA 3' y  
LeLKT1R 5' TCCGAGTCTGTTCTGAACTTCAAG 3' | para *LeLKT1*

LeEF1 $\alpha$ F 5' GGCGGTGGCGAGCAT 3' y  
LeEF1 $\alpha$ R 5' AAACCAAGGCACCTCAACAAA 3' | para el factor de elongación  
1  $\alpha$  de tomate, que fue el  
gen de referencia.

### 3.3. Análisis estadístico

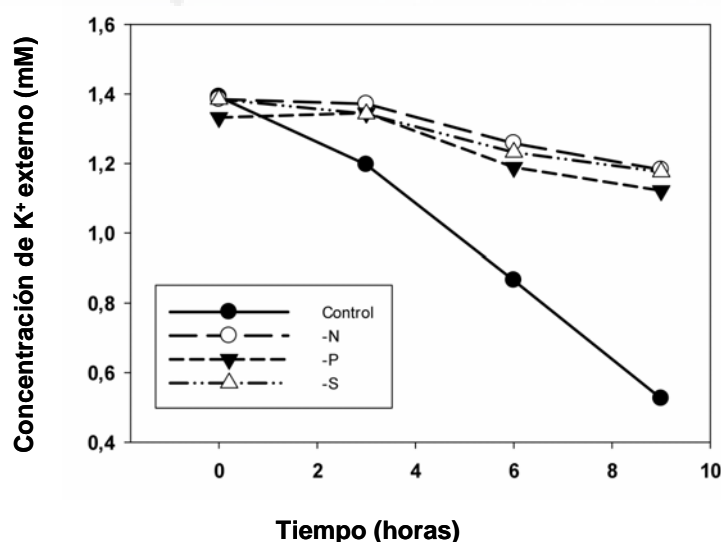
Se realizó un análisis de la varianza con SPSS v.21 para Windows (IBM corporation, Armonk, NY) software. Para determinar las diferencias entre los tratamientos se utilizó el Tukey's Multiple Range a nivel 0.05.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

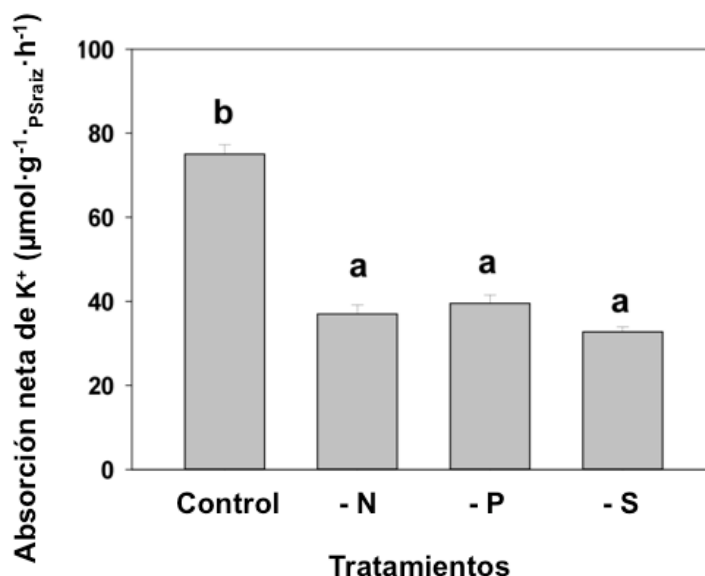
### 4.1. Desaparición de $K^+$

La capacidad de absorción de  $K^+$  en el rango de baja afinidad en las plantas de tomate sometidas a los diferentes tratamientos de deficiencias nutricionales fue determinada por la desaparición de  $K^+$  en la solución externa, como se indicó en la sección de material y métodos. Tras 7 días de falta de nutrientes (N, P y S), las plantas se transfirieron a tubos que contenían 40 mL de la solución nutritiva que contenía 1,4 mM  $K^+$  y se tomaron muestras cada 3h durante 9 h para determinar la concentración de  $K^+$ .

La Fig. 4.1 muestra las curvas de desaparición de un experimento representativo. La mayor capacidad de desaparición de  $K^+$  se observó en las plantas del tratamiento control, y las deficiencias de los tres nutrientes, N, P y S, dieron lugar a una menor capacidad de desaparición de  $K^+$ . A partir de estos datos se calculó el flujo neto de absorción de  $K^+$  (Fig. 4.2), obteniéndose que las deficiencias nutricionales redujeron la absorción de  $K^+$  un 51% (-N), 47 % (-P) y 67 % (-S).



**Figura 4.1.** Desaparición del  $K^+$  externo frente al tiempo en plantas de tomate en ausencia de diferentes nutrientes (N, P y S).

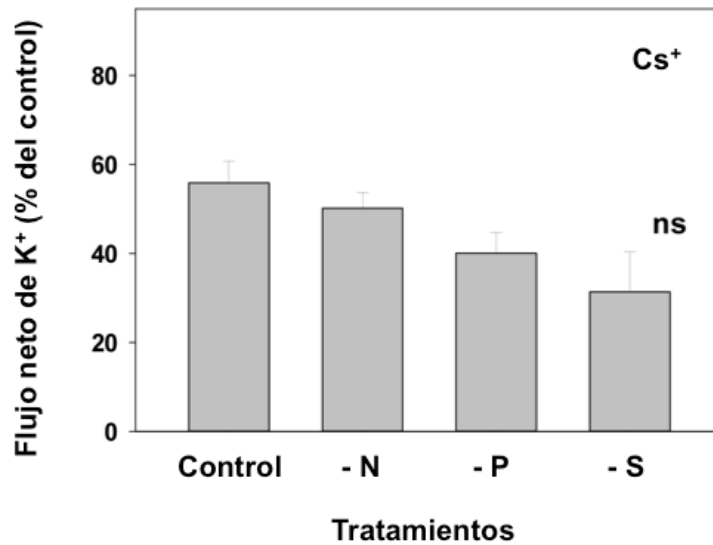


**Figura 4.2.** Flujo neto de absorción K<sup>+</sup> en plantas de tomate expuestas a la ausencia de diferentes nutrientes (N, P y S). Los valores son promedios de cuatro repeticiones. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes a  $P < 0,05$  según la prueba de Tukey.

#### 4.2. Efecto del Cs<sup>+</sup> y del Ca<sup>2+</sup> en la absorción de K<sup>+</sup>

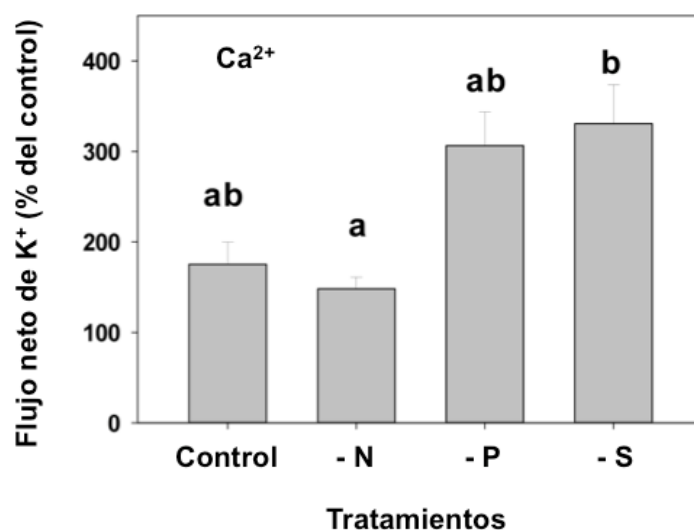
Con el fin de confirmar si la absorción de K<sup>+</sup> de soluciones que contienen 1,4 mM K<sup>+</sup> ocurre principalmente a través del canal LKT1, la absorción se determinó añadiendo Cs<sup>+</sup> (1 mM) y Ca<sup>2+</sup> (20 mM) a la solución de absorción. Se ha indicado que el Cs<sup>+</sup> es un inhibidor de los canales AKT (Amtmann y Sanders, 1999), mientras que el Ca<sup>2+</sup> no inhibe la absorción a través de AKT (Caballero et al., 2012).

Con el fin de comparar el efecto del Cs<sup>+</sup> y el Ca<sup>2+</sup>, la velocidad de absorción fue calculada como porcentaje de la velocidad en ausencia de estos inhibidores (Fig. 4.3 y 4.4). Los resultados indican que la presencia de Cs<sup>+</sup> redujo la absorción de K<sup>+</sup> de un modo similar en todas las ausencias nutricionales, un 44 % en plantas control, y un 50 %, 60 % y 68 % en los tratamientos sin N, sin P, y sin S, respectivamente (Fig. 4.3).



**Figura 4.3.** Flujo neto de absorción K<sup>+</sup> en presencia de Cs<sup>+</sup> en plantas de tomate expuestas a la ausencia de diferentes nutrientes (N, P y S). La tasa de absorción de K<sup>+</sup> se calculó en comparación con el control de la figura 2 sin Cs<sup>+</sup> añadido, tomado como 100%. Se muestran los promedios de las cuatro repeticiones. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes a  $P < 0,05$  según la prueba de Tukey.

La utilización de una alta concentración de Ca<sup>2+</sup> (20 mM) no inhibió la absorción de K<sup>+</sup> comparado con una concentración de Ca<sup>2+</sup> 1,4 mM que era la que contenía la solución nutritiva control, por el contrario se encontró una mayor absorción de K<sup>+</sup> al incrementar el Ca<sup>2+</sup> en la solución nutritiva (Fig. 4.4). Estos resultados indican que bajo nuestras condiciones experimentales la mayor parte de la absorción de K<sup>+</sup> en el rango de la baja afinidad ocurre a través de los canales LKT1.

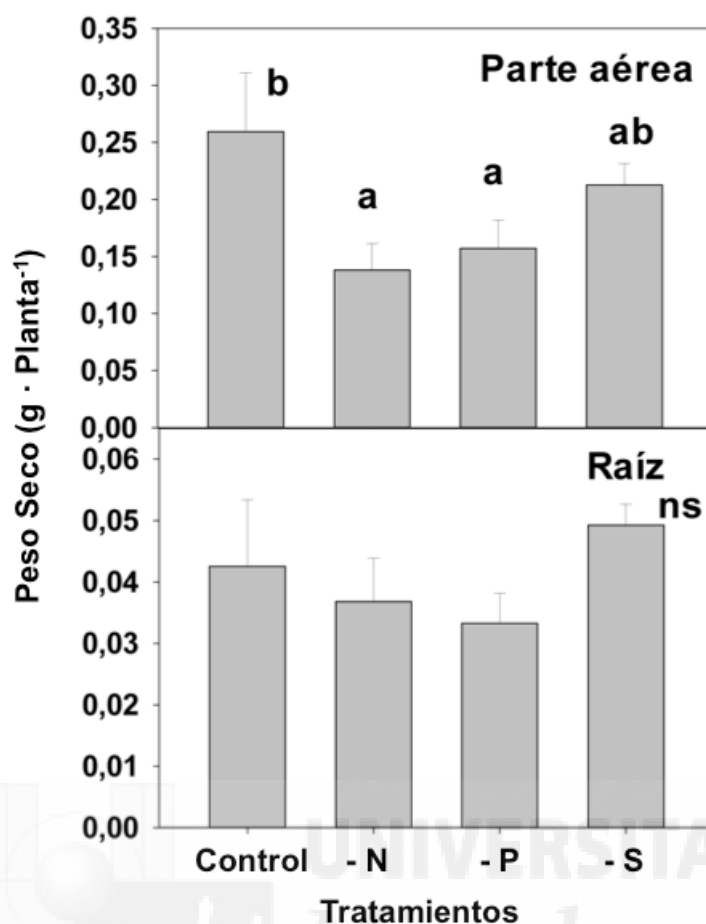


**Figura 4.4.** Flujo neto de absorción K<sup>+</sup> en presencia de Ca<sup>2+</sup> en plantas de tomate expuestas a la ausencia de diferentes nutrientes (N, P y S). La tasa de absorción de K<sup>+</sup> se calculó en comparación con el control de la figura 2 sin Ca<sup>2+</sup> añadido, tomado como 100%. Se muestran los promedios de las cuatro repeticiones. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes a P < 0,05 según la prueba de Tukey.

### 4.3. Peso seco de parte aérea y raíz y concentración de K, N, P y S

Se determinó el peso seco y las concentraciones de N-total, P y S en las plantas de tomate sometidas a diferentes tratamientos. El peso seco de la parte aérea de las plantas control fue de  $0,26 \pm 0,05$  g y la deficiencia de nutrientes redujo el peso seco en todos los casos, sin embargo esta reducción fue mayor en los tratamientos con deficiencia de N y P (47 %, 39 %, respectivamente) que en el tratamiento sin S (18%). Sin embargo, ninguno de los tratamientos dio lugar a diferencias significativas en el peso seco de la raíz (Fig. 4.5).





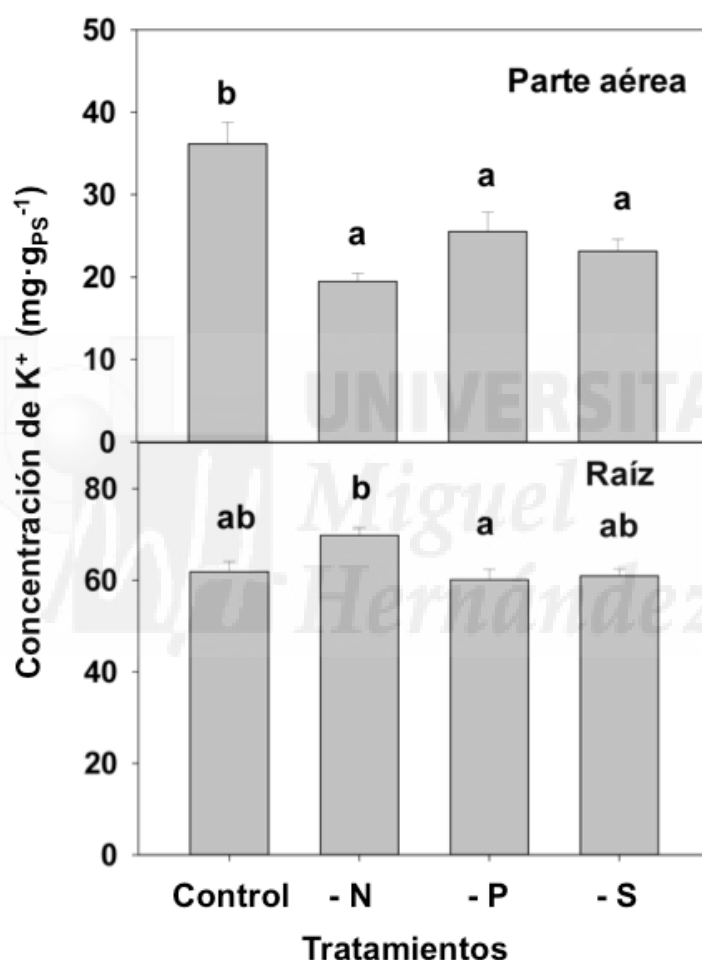
**Figura 4.5.** Peso seco (g/planta) de parte aérea y raíz de plantas de tomate expuestas a diferentes privaciones de nutrientes. Se muestran los promedios de tres repeticiones. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes a  $P < 0,05$  según la prueba de Tukey.

Como era de esperar, la falta de un nutriente (N, P, o S) dio lugar a plantas con menor concentración de ese nutriente tanto en la parte aérea como en la raíz de las plantas de tomate (Tabla 4.1). Para todos los elementos la privación de los mismos originó una menor concentración de éstos en la parte aérea que en la raíz.

	[N <sub>Total</sub> ] (mg / g <sub>PS</sub> )		[P] (mg / g <sub>PS</sub> )		[S] (mg / g <sub>PS</sub> )	
	Raíz	Brote	Raíz	Brote	Raíz	Brote
<b>CONTRO</b>	4,59 ± 0,15 <sup>b</sup>	5,03 ± 0,03 <sup>c</sup>	10,14 ± 0,19 <sup>b</sup>	8,50 ± 0,35 <sup>c</sup>	3,25 ± 0,07 <sup>ns</sup>	4,28 ± 0,32 <sup>b</sup>
<b>-N</b>	2,66 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,66 ± 0,0 <sup>a</sup>	19,45 ± 0,41 <sup>d</sup>	6,53 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,83 ± 0,65 <sup>ns</sup>	3,07 ± 0,13 <sup>a</sup>
<b>-P</b>	3,45 ± 0,10 <sup>b</sup>	4,12 ± 0,39 <sup>b</sup>	4,43 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,64 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,98 ± 0,25 <sup>ns</sup>	3,01 ± 0,34 <sup>a</sup>
<b>-S</b>	4,27 ± 0,21 <sup>b</sup>	3,01 ± 0,03 <sup>b</sup>	13,80 ± 0,47 <sup>c</sup>	7,78 ± 0,19 <sup>c</sup>	2,65 ± 0,42 <sup>ns</sup>	2,16 ± 0,10 <sup>a</sup>

**Tabla 4.1.** Concentraciones totales de N, P y S (mg / g<sub>PS</sub>) en raíz y parte aérea de plantas de tomate sometidas a las diferentes privaciones nutricionales.

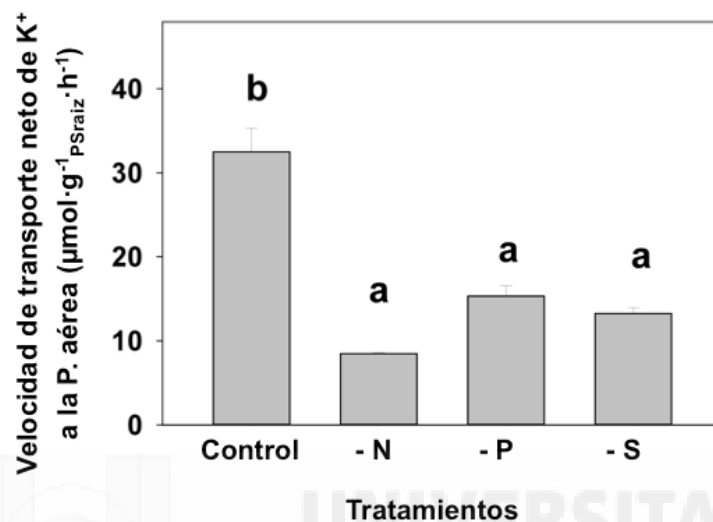
La concentración de  $K^+$  en la parte aérea de las plantas control fue de  $36,14 \text{ mg}\cdot\text{g}_{\text{PS}}^{-1}$  y en la raíz de  $61,84 \text{ mg}\cdot\text{g}_{\text{PS}}^{-1}$  (Fig. 4.6). Cuando las plantas fueron sometidas a deficiencias de nutrientes se produjo una reducción de  $K^+$  en la parte aérea del 46 % (-N), 29 % (-P) y 36 %, (-S) (Fig. 6). Sin embargo, en el caso de la raíz la concentración de  $K^+$  no resultó afectada significativamente por los tratamientos de falta de nutrientes (Fig. 4.6).



**Figura 4.6.** Concentración de  $K^+$  en parte aérea y raíz de plantas de tomate expuestas a diferentes privaciones de nutrientes. Los valores son la media de tres repeticiones. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes a  $P < 0,05$  según la prueba de Tukey.

Se calculó a partir de los datos obtenidos de la concentración total de  $K^+$  en la planta entre dos cosechas realizadas a distintos tiempos (C0 y C1) el transporte de  $K^+$  a la parte aérea. Como se indica en materiales y métodos C0 corresponde a la cosecha antes de aplicar los tratamientos de falta de

nutrientes y C1 es la cosecha realizada después de 7 días con ausencias nutricionales. Así pues, se calculó la velocidad de transporte de  $K^+$  a la parte aérea a partir de los datos de contenido de  $K^+$  durante los 7 días de privación de nutrientes (Fig. 4.7).



**Figura 4.7.** Efecto de la ausencia de nutrientes en la translocación de  $K^+$  a la parte aérea. La tasa de translocación neta se calcula a partir del incremento total de  $K^+$  en parte aérea entre las dos cosechas (C0 y C1), peso seco de raíz y de la unidad de tiempo. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes a  $P < 0,05$  según la prueba de Tukey.

Los resultados indican que la falta de nutrientes redujo significativamente el transporte de  $K^+$  a la parte aérea (Fig 4.7) y en mayor medida que la absorción de  $K^+$ . Aunque no se observaron diferencias significativas en las distintas ausencias nutricionales, los resultados muestran que la falta de N redujo el transporte de  $K^+$  a la parte aérea en mayor medida que la falta de P o S. También el peso seco de la parte aérea fue menor con la deficiencia de N que con la de P o S.

Se calculó el porcentaje de  $K^+$  que fue transportado a la parte aérea sobre el total absorbido. Las plantas control transportaron un 46,1 % del  $K^+$  absorbido, mientras que las plantas -N solo el 29 %, las plantas -P el 39,9 % y las plantas -S el 34,8%.

#### 4.4. Niveles de expresión de *LeKT1*

La expresión de *LeKT1* disminuyó con las diferentes deficiencias nutricionales (Fig. 4.9), lo que está de acuerdo con la absorción de  $K^+$  en el rango de la baja afinidad a través de los canales AKT, y estos datos pueden explicar la menor absorción de  $K^+$  encontrada con los distintos tratamientos de falta de N, P y S.

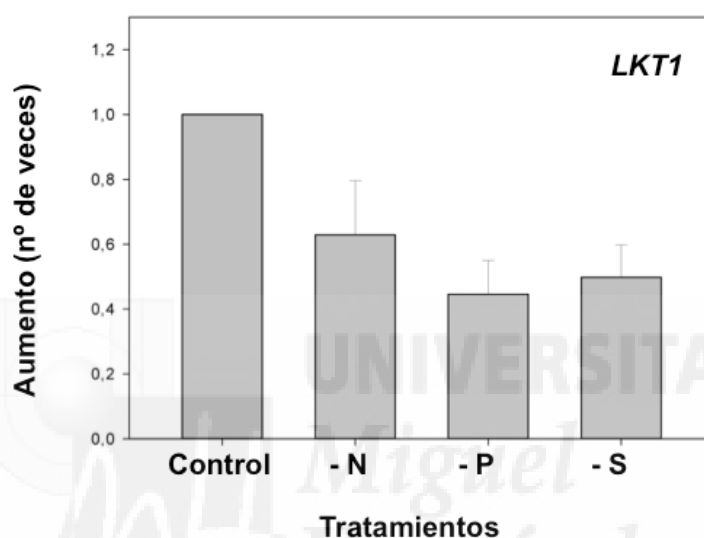


Figura 4.8. Niveles de expresión *LeKT1* en respuesta a la privación de nutrientes

#### 4.5. Discusión

El transportador de  $K^+$  de alta afinidad HAK5 y el canal rectificador de entrada de  $K^+$  AKT1 han sido descritos como las principales vías de entrada de  $K^+$  en las raíces. Sin embargo, algunos estudios en líneas mutantes *hak5*, *akt1* (no expresan HAK5 ni AKT1) de *Arabidopsis* muestran que otros sistemas compensan por la falta de AtHAK5 y AtAKT1 cuando la concentración externa de  $K^+$  está por encima de cierto nivel (Pyo et al., 2010; Rubio et al., 2010; Caballero et al., 2012).

En este trabajo se describe un estudio sobre la regulación del transporte de  $K^+$  en el rango de la baja afinidad mediado por *LeKT1* en respuesta a la

deficiencia de los principales macronutrientes N, P y S en plantas de tomate. Se ha caracterizado la transcripción del gen de tomate *LKT1* mediante PCR cuantitativa (qPCR). Los resultados indican que la falta de nutrientes como N, P o S dan lugar a una reducción en la absorción de  $K^+$  en el rango de la baja afinidad, medido en soluciones que contenían 1,4 mM  $K^+$  (Fig. 4.2).

Recientemente se ha descrito un efecto de las deficiencias nutricionales (-N, -P y -S) en la absorción de  $K^+$  de alta afinidad mediada por HAK5 (Rubio et al., 2014). En el presente trabajo la contribución de HAK5 en el transporte de  $K^+$  puede ser descartada porque la expresión de *LeHAK5* no se activa bajo las condiciones de  $K^+$  aportadas en estos experimentos (1.4 mM  $K^+$ ) (Nieves-Cordones et al., 2007). En este trabajo se muestra que las deficiencias nutricionales también tienen efecto sobre la absorción de  $K^+$  de baja afinidad, que puede tener lugar a través del canal rectificador de entrada AKT o de otros sistemas. Con el fin de determinar si la deficiencia de nutrientes afectaba a la absorción de  $K^+$  a través de *LeKT1* o de otros sistemas se utilizaron  $Cs^+$  y  $Ca^{2+}$  como inhibidores de la absorción de  $K^+$ . En cuanto a la utilización de  $Cs^+$ , este sirve para separar farmacológicamente la entrada de  $K^+$  a través de canales selectivos de entrada de  $K^+$  o de canales de entrada no selectivos (Amtmann y Sanders, 1999), ya que los primeros son bloqueados por  $Cs^+$  pero los segundos no (Very y Sentenac, 2002). En cuanto a la utilización de  $Ca^{2+}$ , se ha visto en *Arabidopsis* que cuando el canal AKT no se encuentra presente, la actividad de otro sistema que es muy sensible a  $Ca^{2+}$  aumenta (Caballero et al., 2012). Los resultados indican que bajo todas las deficiencias nutricionales (N, P, S) el  $Cs^+$  redujo la absorción de  $K^+$ , mientras que el  $Ca^{2+}$  no, de hecho con  $Ca^{2+}$  en la solución de absorción se produjo una mayor absorción de  $K^+$ . Por lo tanto, estos resultados obtenidos con  $Cs^+$  y  $Ca^{2+}$  indican que el  $K^+$  entra principalmente a través de canales selectivos de  $K^+$  como es *LKT1*, y no a través de canales catiónicos no selectivos, como podría ser el tercer sistema descrito en *Arabidopsis* (Caballero et al., 2012), que es muy sensible a  $Ca^{2+}$ .

Además en las plantas de tomate la expresión de *LKT1* disminuyó con todas las diferentes deficiencias nutricionales (Fig. 4.9), lo que está de acuerdo

con la absorción a través de canales tipo AKT, y por lo tanto puede explicar las menores velocidades de absorción de  $K^+$  encontradas.

La menor absorción de  $K^+$  en condiciones de deficiencia nutricional podría ser atribuido, no solo a la menor expresión de *LKT1*, sino también a cambios en el potencial de membrana. Los resultados obtenidos por Rubio et al., (2014) indican que la privación de nutrientes no causó una despolarización de la membrana, sino que de forma significativa, se produjo una hiperpolarización del potencial de membrana en todos los casos, con respecto al tratamiento control.

En general, a diferencia de lo que ocurre con los genes *HAK5*, en la bibliografía hay acuerdo en que para la mayoría de las especies, los niveles de transcripción de *AKT1* son insensibles a la concentración externa de  $K^+$  (Lagarde et al., 1996). Sin embargo, se ha descrito una regulación de la actividad del canal por fosforilación y por interacción con otras proteínas, así la fosforilación de AKT1 por CIPK23 activa el canal, aumentando así la absorción de  $K^+$  mediada por AKT (Cheong et al., 2007; Lee et al., 2007; Li et al., 2006; Luan et al., 2009; Xu et al., 2006). Estos resultados sugieren que la regulación transcripcional puede ser un mecanismo más importante para los genes reguladores de AKT1 que la regulación del propio gen *AKT* (Wang y Wu, 2013).

Aunque se han encontrado pocos genes de canales de  $K^+$  que sean transcripcionalmente regulados por deficiencia de  $K^+$ , un canal Shaker de  $K^+$  de trigo, *TaAKT1*, se ha visto que se induce por deficiencia de  $K^+$  (Buschmann et al., 2000). De un modo similar, en plantas de tomate se ha visto que la deficiencia de  $K^+$  daba lugar a una ligera inducción de AKT (Nieves-Cordones, Tesis). Nuestros resultados en plantas de tomate muestran que los niveles de expresión de *LKT1* disminuyen con las diferentes deficiencias nutricionales, por lo que tal vez existan determinadas condiciones en las que AKT pueda ser transcripcionalmente regulado, como ha sido demostrado que ocurre en condiciones de falta de nutrientes como  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$  y  $SO_4^{2-}$ .

La capacidad para que una planta pueda utilizar un determinado nutriente depende de la disponibilidad de los otros nutrientes. Se puede, por lo

tanto esperar que los transportadores de nutrientes estén también regulados por nutrientes que no sean sustrato de los mismos (Ammann y Blatt, 2009). Recientemente han aparecido evidencias en la bibliografía de componentes comunes en la respuesta de las plantas a la disponibilidad de diferentes nutrientes minerales: 1) Uno de los primeros eventos que ocurre cuando se produce la privación de un nutriente es un cambio en el potencial de membrana (Ammann et al., 2006, 2) Estudios sobre la señalización en la respuesta de las plantas a las deficiencias nutricionales han mostrado que deficiencias de diferentes nutrientes pueden inducir los mismos componentes de señalización, como ROS, en las primeras etapas de la deficiencia nutricional (Schachtman y Shin, 2007; Shin et al., 2005), y hormonas (Rubio et al., 2009), y 3) Algunos estudios muestran que al eliminar uno de los nutrientes casi siempre se produce un cambio en la transcripción de genes implicados en el transporte de otros nutrientes (Wang et al., 2002; Hammond et al., 2003, Maathuis et al., 2003; Nikiforova et al., 2003). Todo esto indica que debe existir algún punto común en las diferentes vías de señalización en las respuestas de las plantas a las diferentes deficiencias nutricionales (Wan y Wu, 2013).

Investigaciones recientes indican que la señalización nutricional de  $K^+$  tiene una relación próxima a la nutrición nitrogenada, tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (Tsay et al., 2011). La deficiencia de  $K^+$  altera la transcripción de genes transportadores de  $NO_3^-$  (Armengaud et al., 2004; Lin et al. 2008) y en plantas mutantes que no expresan NRT1.5 (un transportador de  $NO_3^-$  responsable de la carga de  $NO_3^-$  al xilema), se reduce el transporte de  $K^+$  desde la raíz a la parte aérea (Lin et al., 2008). Estos resultados sugieren que la absorción de  $NO_3^-$  y el transporte del mismo deben estar de alguna manera relacionados con los niveles de aporte de  $K^+$  y que el transporte de  $K^+$  en las plantas también depende del transporte de  $NO_3^-$  (Lin et al., 2008). Nuestros resultados confirman que la falta de  $NO_3^-$  redujo tanto la absorción como el transporte de  $K^+$  a la parte aérea en las plantas de tomate.

Además, estudios sobre la regulación post-traducciona de los canales de  $K^+$  y de transportadores de  $NO_3^-$  indican que ambos pueden compartir el mismo o similar mecanismo de regulación. La proteína quinasa CIPK23, un

regulador positivo del canal AKT1 de  $K^+$ , modula la actividad del transportador CHL1 de  $NO_3^-$  (Ho et al., 2009; Xu et al., 2006). CIPK23 podría actuar como un nudo importante en la red reguladora de la nutrición mineral en las plantas y controlar simultáneamente la absorción de ambos,  $K^+$  y  $NO_3^-$  (Ho et al., 2009). Sin embargo, según nuestros resultados, el efecto de la falta de  $NO_3^-$  se produjo a nivel transcripcional, como ya se ha comentado. Tal vez la regulación de AKT por CIPK23 ocurra solo en condiciones de deficiencia de  $K^+$ , lo cual no ocurre en las presentes condiciones experimentales.

La importancia de que se dé una correlación entre la nutrición de  $K^+$  y N es claramente el mantenimiento de un balance en la absorción de  $K^+$  y  $NO_3^-$ , así como en el transporte a la parte aérea y en los procesos metabólicos en plantas (Wang y Wu, 2013).

Para explicar las interacciones entre la absorción de diferentes nutrientes, como es el caso de un cationes como el  $K^+$  con aniones como  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$  y  $SO_4^{2-}$ , se deben considerar también otros factores, como son el balance catión-anión, la velocidad de crecimiento, y el estado nutricional de la planta. Frecuentemente ha podido observarse la estimulación de la absorción de cationes por aniones y de la absorción de aniones por cationes, y esto es generalmente la consecuencia de la necesidad de mantener un balance de cargas (Marchner, 2012). Velocidades diferentes de absorción de cationes y aniones requiere tanto una compensación de cargas eléctricas como una regulación del pH celular (Marschner, 2012). Cuando se encuentran a una concentración baja en la rizosfera, la velocidad de absorción de un cation no se ve afectada por el anión acompañante y viceversa. Sin embargo, a alta concentración externa, el ión acompañante puede afectar la absorción de otro ión con carga contraria, debido a que los requerimientos para la compensación de las cargas eléctricas y la regulación del pH celular pueden llegar a ser un factor limitante, como puede observarse en el presente trabajo en el que la falta de aniones en el medio como  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$  o  $SO_4^{2-}$ , da lugar a una menor absorción de un cation como el  $K^+$ .

Como se ha comentado, la menor expresión de *LeKT1* bajo deficiencia nutricional puede explicar en parte las menores velocidades de absorción de



$K^+$ , pero las deficiencias nutricionales también dieron lugar a una menor translocación de este a la parte aérea. El xilema es responsable del transporte de  $K^+$  desde la raíz a la parte aérea, sin embargo el transporte a larga distancia no implica que sea unidireccional, ya que una gran proporción del  $K^+$  de la parte aérea es reenviado a la raíz a través del floema (Marschner et al., 1997). La velocidad de absorción de un nutriente a una determinada concentración externa viene a menudo determinada por la velocidad de crecimiento de la planta, que puede afectar así la absorción del nutriente a través del estado nutricional de la planta (Walker et al., 2001). Un crecimiento y desarrollo rápido requiere grandes flujos de  $K^+$  para proporcionar este ión a los tejidos en crecimiento. Los análisis clásicos de electrofisiología han revelado que la absorción de  $K^+$  por las raíces se sintoniza en respuesta a la demanda de la parte aérea (Pilot et al., 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una disminución en el crecimiento de la parte aérea de las plantas de tomate, pero no de la raíz (Fig. 5), por lo tanto, por un lado la demanda de  $K^+$  por la parte aérea puede estar reducida y por otro lado la cantidad de  $K^+$  retransportada desde la parte aérea a la raíz vía floema puede ser parte de una señal que controle la cantidad de  $K^+$  que se secrete al xilema radicular para finalmente ayudar a sincronizar la absorción radicular de  $K^+$  con la demanda de la parte aérea para su crecimiento (Drew y Saker, 1984; Marschner et al., 1996; White, 1997). Así pues, las deficiencias nutricionales pueden disminuir la carga de  $K^+$  en el xilema, y con ello el transporte a la parte aérea y de esa manera se puede regular el crecimiento de la parte aérea dependiendo de las condiciones ambientales. Pero además de este efecto de las deficiencias nutricionales sobre el transporte a la parte aérea, el presente trabajo muestra que en alguna medida la regulación de la absorción de  $K^+$  se ha realizado a través de una menor expresión de gen del canal *LeKT1* en las raíces de plantas bajo deficiencias de nutrientes como N, P o S.

El estudio realizado en plantas de tomate sometidas a deficiencias nutricionales nos lleva a pensar que en el futuro será importante la investigación sobre la interdependencia entre los distintos nutrientes, sus rutas de señalización y los procesos fisiológicos. La identificación de elementos reguladores en la absorción de nutrientes aumentará no solo el entendimiento

de como la plantas se adaptan a condiciones de escasez de nutrientes sino también proporcionará objetivos potenciales para futuros esfuerzos en bioingeniería que vayan encaminados a mejorar el comportamiento de los cultivos en suelos marginales.



## 5. CONCLUSIONES

1. La deficiencia de los principales macronutrientes N, P y S redujo la absorción de  $K^+$  en el rango de la baja afinidad. Esto ocurrió sin afectar de manera importante al contenido de  $K^+$  de las células radicales.
2. Bajo todas las deficiencias nutricionales (N, P y S) la presencia de  $Cs^+$  en la solución de absorción redujo la absorción de  $K^+$ , mientras que la presencia de  $Ca^{2+}$  la aumentó, indicando que en este rango de concentración la absorción de  $K^+$  tiene lugar mayoritariamente a través canales selectivos de  $K^+$  como LKT1 (sensible al  $Cs^+$ ) y no a través de canales catiónicos no selectivos (sensible al  $Ca^{2+}$ ).
3. Los niveles de expresión del gen *LKT1* disminuyeron con las diferentes deficiencias nutricionales, lo que explicaría la menor absorción de  $K^+$ .
4. Algunos componentes implicados en las señalizaciones nutricionales y en las respuestas a la disponibilidad de nutrientes, son comunes para diferentes nutrientes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**Alemán F, Nieves-Cordones M, Martínez V, Rubio F** (2011) Root K<sup>+</sup> Acquisition in Plants: The Arabidopsis thaliana Model. *Plant and Cell Physiology* 52(9):1603-1612.

**Amtmann A, 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, Armengaud P, Volkov V, Michael RB** (2004) Potassium nutrition and salt stress. In *Membrane transport in plants*. Blackwell, Oxford, 293-339.

**Amtmann A, Hammond JP, Armengaud P, White PJ, Callow JA** (2006) Nutrient Sensing and Signalling in Plants: Potassium and Phosphorus. *Advances in Botanical Research*, (Academic Press, London), Vol Volume 43, 209-257.

**Amtmann A, Blatt M R** (2009) Regulation of macronutrient transport. *New Phytol* 181:35-52.

**Amtmann A, Sanders D** (1999) Mechanisms of Na<sup>+</sup> uptake by plant cells. *Adv Bot Res* 29:75-112.

**Armengaud P, Breitling R, y Amtmann A** (2004) The Potassium-Dependent Transcriptome of Arabidopsis Reveals a Prominent Role of Jasmonic Acid in Nutrient Signaling. *Plant Physiol* 136:2556-2576.

**Armengaud P, Sulpice R, Miller AJ, Stitt M, Amtmann A, Gibon Y** (2009) Multilevel Analysis of Primary Metabolism Provides New Insights into the Role of Potassium Nutrition for Glycolysis and Nitrogen Assimilation in Arabidopsis Roots. *Plant Physiology* 150:772-785.

**Azcon-Bieto J, y Talón M** (2008). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Ed Mc Graw Hill Interamericana. Barcelona.

**Blevins DG, Barnett NM, Frost WB** (1978) Role of Potassium and Malate in Nitrate Uptake and Translocation by Wheat Seedlings. *Plant Physiol* 62(5):784-788.

**Buschmann PH, Vaidyanathan R, Gassmann W, Schoeder JL** (2000) Enhancement of Na<sup>+</sup> Uptake Currents, Time-Dependent Inward-Rectifying K<sup>+</sup> Channel Currents, and K<sup>+</sup> Channel Transcripts by K<sup>+</sup> Starvation in Wheat Root Cells. *Plant Physiology* 122:1387-1398.

**Caballero F, Botella M.A, Rubio L, Fernández J.A, Martínez V, Rubio F**, (2012). A Ca<sup>2+</sup>-sensitive system mediates low-affinity K<sup>+</sup> uptake in the absence of AKT1 in Arabidopsis plants. *Plant and Cell Physiology*, 53:2047-2059.

**Cheong YH, Pandey GK, Grant JJ, Batistic O, Li L, Kim BG, Lee SC, Kudla J, Luan S** (2007) Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis. *The Plant Journal* 52:223-239.

**Demidchik V, Maathuis F** (2007) Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol* 175:387-404.

**Dietrich P, Anschütz U, Kugler A, Becker D** (2010) Physiology and biophysics of plant ligand-gated ion channels. *Plant Biology* 12:80-93.

**Drew MC, Saker LR** (1984) Uptake and long-distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to internal ion concentration in barley: evidence for non-allosteric regulation. *Planta* 160:500-507.

**Elumalai RP, Nagpal P, Reed JW** (2002) A Mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 Potassium Transporter Gene Affects Shoot Cell Expansion. *The Plant Cell* 14:119-131.

**Epstein E, Hagen CE** (1952) A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiol.* 27:457-474.

**Epstein E, Rains DW, Elzam OE** (1963) Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 49:684-692.

**Garciadeblas B, Barrero-Gil J, Benito B, Rodriguez-Navarro A** (2007) Potassium transport systems in the moss *Physcomitrella patens*: pphak1 plants reveal the complexity of potassium uptake. *Plant Journal* 52.

**Gierth M, Maser P, Schroeder JI** (2005) The Potassium Transporter AtHAK5 Functions in K<sup>+</sup> Deprivation-Induced High-Affinity K<sup>+</sup> Uptake and AKT1 K<sup>+</sup> Channel Contribution to K<sup>+</sup> Uptake Kinetics in Arabidopsis Roots. *Plant Physiol* 137(3):1105-1114.

**Gierth M, Maser P** (2007) Potassium transporters in plants - Involvement in K<sup>+</sup> acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters* 581:2348-2356.

**Glass AD, Dunlop J.** (1978) The influence of potassium content on the kinetics of potassium influx into excised ryegrass and barley roots. *Planta* 141:117-119.

**Hammond JP, Bennett MJ, Bowen HC, Broadley MR, Eastwood DC, May ST, Rahn C, Swarup R, Woolaway KE, White PJ.** (2003) Changes in gene expression in Arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiology* 132:578-596.

**Hartt CE** (1969) Effect of Potassium Deficiency Upon Translocation of C-14 in Attached Blades and Entire Plants of Sugarcane. *Plant Physiology* 44(10):1461-1469

**Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR** (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280(5365):918-921.

- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF** (2009) CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* 138:1184-1194
- Ho C-H, Tsay Y-F** (2010) Nitrate, ammonium, and potassium sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* In Press, Corrected Proof.
- Jackson WA** (1960) *Soil chemical analysis*. Clife. N.J.: Prentice-Hall, Inc. Englewood.
- Jones SM** (1983) Demonstration of active potassium secretion in the late Distal Tubule. *Am. J. Physiol.* (245) F:83.
- Kaplan B, Sherman T, Fromm H** (2007) Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters* 581(12):2237-2246.
- Karley AJ, White PJ** (2009) Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Current Opinion in Plant Biology* 12:291-298.
- Koch K, Mengel K** (1974) The influence of the level of potassium supply to young tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) on short-term uptake and utilisation of nitrate nitrogen (15N). *J Sci Food Agr* 25(5):465-471.
- Kochian LV, Lucas, W.J.** (1998). Potassium transport in roots. *Adv. Bot. Res.* 15:93-178.
- Krouk G, Crawford NM, Coruzzi GM, Tsay Y-F** (2010) Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology* 13(3):265-272.
- Lagarde D, Basset M, Lepetit M, Conejero G, Gaymard F, Astruc S, Grignon C** (1996) Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K<sup>+</sup> nutrition. *Plant J* 9(2):195-203.
- Lee SC, Lan WZ, Kim BG, Li L, Cheong YH, Pandey GK, Lu G, Buchanan BB, Luan S**, (2007) A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(40):15959-15964.
- Leigh RA, Jones RGW** (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 X, Borsics T, Harrington HM, Christopher DA** (2005) Arabidopsis AtCNGC10 rescues potassium channel mutants of *E. coli*, yeast and Arabidopsis and is regulated by calcium-/- calmodulin and cyclic GMP in *E. coli*. *Functional plant biology* 32(7):643-653.
- Li L, Kim BG, Cheong YH, Pandey GK, Luan S** (2006) A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K<sup>+</sup> channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:12625-12630.

- Lin S-H, Kuo H-F, Canivenc G, Lin C-S, Lepetit M, Hsu P-K, Tillard P, Lin H-L, Wang Y-Y, Tsai C-B, Gojon A, Tsay Y-F** (2008) Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 Nitrate Transporter Causes Defective Root-to-Shoot Nitrate Transport. *Plant Cell* 20:2514-2528
- Luan S, Lan W, 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 FJM** (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol* 12: 250-258.
- Maathuis FJ, Filatov V, Herzyk P, Krijger GC, Axelsen KB, Chen S, Green BJ, Li Y, Madagan KL, Sanchez-Fernandez R, Forde BG, Palmgren MG, Rea PA, Williams LE, Sanders D, Amtmann A** (2003) Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant Journal* 35:675-692.
- Maathuis FJM, Sanders D** (1993) Energization of potassium up-take in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 191:302-307.
- Maathuis FJM, 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 FJM, Sanders D** (1996) Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol Plant* 96:158-168.
- Mahouachi J, Socorro AR, 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. Springer, New York.
- Marschner P** (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (3<sup>rd</sup> Edn). Academic Press, San Diego.
- Marschner H, Kirkby EA, Cakmak I** (1996) Effect of the nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J Exp Bot* 47:1255-1263.
- Marschner P, Crowley DE, Higashi RM** (1997) Root exudation and physiological a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non my papper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Soil* 189:11-20.
- Maser P, Gierth M, Schroeder JI** (2002) Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and Soil* 247:43-54.
- Meharg A, Blatt M** (1995) NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Transport Across the Plasma-Membrane of *Arabidopsis-Thaliana* Root Hairs - Kinetic Control by PH and Membrane Voltage. *The journal of membrane biology* 145(1):49-66.

**Nieves-Cordones M.** (2009). Sistemas implicados en la absorción de K<sup>+</sup> en plantas: tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y *Arabidopsis thaliana* L. Tesis Doctoral.

**Nieves-Cordones M, Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F** (2007) An NH<sub>4</sub><sup>+</sup> -sensitive component dominates high-affinity K<sup>+</sup> uptake in tomato plants. *Plant Science* 172(2):273-280.

**Nieves-Cordones M, Miller A, Alemán F, Martínez V, Rubio F** (2008) A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Molecular Biology* 68(6):521-532.

**Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R** (2003) Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant Journal* 33:633-650.

**Philippar K, Fuchs I, Luthen H, Hoth S, Bauer CS, Haga K, Thiel G, Ljung K, Sandberg G, Bottger M, Becker D, Hedrich R** (1999) Auxin-induced K<sup>+</sup> 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.

**Pier PA, Berkowitz GA** (1987) Modulation of Water-Stress Effects on Photosynthesis by Altered Leaf K<sup>+</sup>. *Plant Physiology* 85:655-661.

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

**Pyo YJ, Gierth M, Schroeder JI, Cho MH** (2010) High-Affinity K<sup>+</sup> Transport in *Arabidopsis*: AtHAK5 and AKT1 Are Vital for Seedling Establishment and Postgermination Growth under Low-Potassium Conditions. *Plant Physiol.* 153(2):863-875.

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

**Rodríguez-Navarro A, Rubio F** (2006) High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J Exp Bot* 57(5):1149-1160.

**Ruan Y-L, Llewellyn DJ, Furbank RT** (2001) The Control of Single-Celled Cotton Fiber Elongation by Developmentally Reversible Gating of Plasmodesmata and Coordinated Expression of Sucrose and K<sup>+</sup> Transporters and Expansin. *Plant Cell* 13:47-60.

**Rubio F, Alemán F, Nieves-Cordones M, Vicente M** (2010) Studies on *Arabidopsis* AtHAK5, AtAKT1 double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K<sup>+</sup> uptake. *Physiol Plant* 139:220-228.

**Rubio F, Fon M, Rodenas R, Nieves-Cordones M, Alemán F, Rivero R M, Martínez V** (2014) A low K<sup>+</sup> signal is required for functional high-affinity K<sup>+</sup> uptake through HAK5 transporters. *Physiol Plant.* 152(3):558-70.



- Rubio F, Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V** (2008) Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K<sup>+</sup> uptake in the high-affinity range of concentrations *Physiol Plant* 134:598-608.
- Rubio JS, García-Sánchez F, Rubio F, Martínez V** (2009) Yield, blossom end rot incidence, and fruit quality in pepper plants under moderate salinity are affected by K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> fertilization. *Scientia Horticulturae* 119:79-87.
- Rufty TW, Jackson WA, Raper CD** (1981) Nitrate Reduction in Roots as Affected by the Presence of Potassium and by Flux of Nitrate through the Roots. *Plant Physiol* 68(3):605-609.
- Ruiz JM, Romero L** (2002) Relationship between potassium fertilisation and nitrate assimilation in leaves and fruits of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Annals of Applied Biology* 140(3):241-245.
- Santa-María GE, Rubio F, Dubcovsky J, Rodríguez-Navarro A** (1997) The HAK1 Gene of Barley is a Member of a Large Gene Family and Encodes a High-Affinity Potassium Transporter. *Plant Cell* 9:2281-2289.
- Schachtman DP, Shin R** (2007) Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annual Review of Plant Biology* 58:47-69.
- Schroeder JI, Ward JM, Gassmann W** (1994) Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in higher plants: biophysical implications for K<sup>+</sup> uptake. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23:441-471.
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C** (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256:663-665.
- Shin R, Berg RH, Schachtman DP** (2005) Reactive Oxygen Species and Root Hairs in Arabidopsis Root Response to Nitrogen, Phosphorus and Potassium Deficiency. *Plant Cell Physiol.* 46(8):1350-1357.
- Tsay Y-F, Ho C-H, Chen H-Y, Lin S-H** (2011) Integration of Nitrogen and Potassium Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 62(1):null.
- Very AA, Sentenac H** (2002) Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane. *Trends in Plant Science* 7:168-175.
- Very AA, Sentenac H** (2003) Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants *Ann Rev Plant Biol* 54(1):575-603.
- Walker BH, Abel NA, Miller AJ** (1996) Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10510–10514.
- Walker RL, Burns IG, Moorby J** (2001) Responses of plant growth rate to nitrogen supply: a comparison of relative addition and N interruption treatments. *J Exp. Bot.* 52:309-317.
- Wang YH, Garvin DF, Kochian LV** (2001) Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol* 127(1):345-359.

**Wang YH, Garvin DF, Kochian LV** (2002) Rapid Induction of Regulatory and Transporter Genes in Response to Phosphorus, Potassium, and Iron Deficiencies in Tomato Roots. Evidence for Cross Talk and Root/Rhizosphere-Mediated Signals. *Plant Physiol* 130:1361-1370.

**Wang Y, Wu WH** (2013) Potassium transport and signaling in higher plant. *Ann Rev Plant Biol* 64:451-76.

**Wei Yang TJ, Perry PJ, Ciani S, Pandian S, Schmidt W** (2008) Manganese deficiency alters the patterning and development of root hairs in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 59(12):3453-3464.

**White PJ** (1997) The regulation of K<sup>+</sup> influx into roots of rye (*Secale cereale* L.) seedlings by negative feedback via the K<sup>+</sup> flux from shoot to root in the phloem. *J Exp Bot* 48:2063–2073

**White PJ, Karley AJ** (2010) Potassium. *Cell Biology of Metals and Nutrients*, ed Hell RMRR (Springer, Heidelberg), Vol 17, pp 199-224.

**Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH** (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* 125:1347-1360.

