



**Universidad Miguel Hernández de Elche**

Programa de doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,  
Agroambientales y Alimentarias

**Caracterización de la Absorción de  $K^+$  en *Arabidopsis thaliana* L. y *Solanum lycopersicum* L.: Regulación de AtHAK5, papel de SlHAK5 e identificación de nuevos sistemas de absorción de  $K^+$**

Autor:

Alberto Lara Hurtado

Directora:

Dra. Dña. María Ángeles Botella Marrero

Codirector:

Dr. D. Francisco Rubio Muñoz

Orihuela, diciembre de 2020





**Universidad Miguel Hernández de Elche**

Programa de doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,  
Agroambientales y Alimentarias

**Caracterización de la Absorción de  $K^+$  en *Arabidopsis thaliana* L. y *Solanum lycopersicum* L.: Regulación de AtHAK5, papel de SlHAK5 e identificación de nuevos sistemas de absorción de  $K^+$**

Autor:

Alberto Lara Hurtado

Directora:

Dra. Dña. María Ángeles Botella Marrero

Codirector:

Dr. D. Francisco Rubio Muñoz

Orihuela, diciembre de 2020



## PUBLICACIONES

Parte de los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos en revistas científicas:

Alberto Lara, Reyes Ródenas, Zaida Andrés, Vicente Martínez, Francisco J. Quintero, Manuel Nieves-Cordones, M. Angeles Botella and Francisco Rubio, "*AtHAK5-mediated root high-affinity K<sup>+</sup> uptake is regulated by the protein kinases AtCIPK1 and AtCIPK9*" **Journal of Experimental Botany**. 71 (16) (2020).

Manuel Nieves-Cordones\*, Alberto Lara\*, Martha Silva, Jesús Amo, Pascual Rodríguez-Sepulveda, Rosa M. Rivero, Vicente Martínez, M. Angeles Botella, Francisco Rubio. "*Root high-affinity K<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> uptake and plant fertility in tomato plants are dependent on the activity of the high-affinity K<sup>+</sup> transporter SHAK5*". **Plant, Cell & Environment**. 43 (7) (2020).

\* Primer autor compartido.



**D. Francisco Rubio Muñoz**, Dr. Ingeniero Agrónomo, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

**Dña. María Ángeles Botella Marrero**, Dra. en Biología y Catedrática del Área de Fisiología Vegetal de la Universidad Miguel Hernández,

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral Titulada “**Caracterización de la absorción de K<sup>+</sup> en *Arabidopsis thaliana* L. y *Solanum lycopersicum* L.: Regulación de AtHAK5, papel de SIHAK5 e identificación de nuevos sistemas de absorción de K<sup>+</sup>**” de la que es autor el graduado en Ingeniería Agroalimentaria y Agroambiental, D. Alberto Lara Hurtado, ha sido realizada bajo nuestra dirección y autorizamos que sea presentada para optar a la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste a los efectos oportunos se firma el presente certificado en Orihuela a 22/12/2020.

Dr. Francisco Rubio Muñoz

Dra. María Ángeles Botella Marrero





**Dr. Dña. Juana Fernández López**, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad MiguelHernández de Elche (UMH),

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización de la absorción de K<sup>+</sup> en *Arabidopsis thaliana* L. y *Solanum lycopersicum* L.: Regulación de AtHAK5, papel de SHAK5 e identificación de nuevos sistemas de absorción de K<sup>+</sup>”** de la que es autor el graduado en Ingeniería Agroalimentaria y Agroambiental **D. Alberto Lara Hurtado**, ha sido realizada bajo la dirección de la **Dra. María Ángeles Botella Marrero** y la codirección del **Dr. Francisco Rubio Muñoz**, actuando como tutora de la misma la Dra. Concepción Obón de Castro. Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo por tanto apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a quince de abril de dos mil veintiuno.

Dra. Dña. Juana Fernández López

Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA

*Coordinadora: Dra. Juana Fernández López  
Dpto. Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Ctra.  
Beniel Km 3,2 Orihuela-03312, Alicante, España  
[j.fernandez@umh.es](mailto:j.fernandez@umh.es); Tlfn: +34 966749784*



## RESUMEN

El  $K^+$  es un elemento imprescindible en las células vivas vegetales, el cual, puede llegar a suponer un 10% del peso seco de la planta, siendo considerado un macronutriente en la nutrición vegetal. Durante el siglo XXI, la agricultura deberá ser capaz de hacer frente al aumento de la demanda de productos agrícolas en unas condiciones climáticas cada vez más desfavorables, sumado a la necesidad de minimizar los insumos en las explotaciones agrícolas para garantizar la rentabilidad de las mismas. La obtención y desarrollo de cultivos cada vez más eficientes en la extracción de nutrientes, así como más tolerantes a los diferentes estreses tanto bióticos como abióticos resultan clave para lograr dicho objetivo.

El transportador de  $K^+$  AtHAK5 y el canal rectificador AKT1 han sido descritos en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* como los principales responsables de la absorción de  $K^+$  por la raíz, estando la actividad de estos sistemas condicionada por las condiciones ambientales. Estos sistemas de transporte de  $K^+$  se han descrito en otras especies vegetales, aunque en cada una de ellas pueden existir diferencias funcionales específicas. En condiciones de deficiencia de  $K^+$ , AtHAK5 es el principal sistema que permite la entrada de  $K^+$  al interior de la planta, produciéndose la activación de este transportador por el complejo AtCIPK23/AtCBL1. En esta Tesis Doctoral se demuestra cómo, a parte de este complejo, otros complejos AtCIPK/AtCBL son capaces de activar dicho transportador, como es el caso AtCIPK1/AtCBL1, AtCIPK1/AtCBL9 y AtCIPK9/AtCBL1. El estudio en profundidad de esta compleja red de señalización es imprescindible para comprender la regulación de la absorción de  $K^+$  y los mecanismos implicados en hacer frente a distintas condiciones de estrés y poder así desarrollar plantas más tolerantes a dichos estreses.

Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral en tomate, empleando mutantes obtenidos mediante CRISPR-Cas, han permitido demostrar el papel del transportador SIHAK5 en la nutrición de  $K^+$  en esta especie vegetal. Se ha observado que este transportador de  $K^+$  es la principal vía de entrada de  $K^+$  en el rango micromolar, así como de  $Cs^+$ . Por otra parte, es imprescindible para mantener una correcta nutrición de  $K^+$  en condiciones de estrés salino, jugando así un papel importante en la tolerancia a la salinidad. Además, este sistema parece desempeñar un importante papel en la fertilidad de la planta, ya que está implicado en la absorción de  $K^+$  en el tubo polínico durante su crecimiento. El estudio de especies vegetales distintas a *Arabidopsis* permite poner de manifiesto las diferencias y similitudes que puedan existir en la función de los sistemas de transporte de  $K^+$  entre especies.

En esta Tesis Doctoral también se describen distintos estudios realizados con el doble mutante de *Arabidopsis* con pérdida de función para los genes *AtHAK5* y *AKT1*, que ponen de manifiesto una tercera vía de entrada de  $K^+$  a través de la raíz, distinta de *AKT1* y *AtHAK5*. El mutante *athak5akt1* presenta una alta sensibilidad a  $Cs^+$  ya que presenta una baja discriminación entre  $K^+$  y  $Cs^+$ , lo cual indica que el  $Cs^+$  está entrando en la raíz a través del

mismo sistema de absorción de  $K^+$ . Una mutagénesis con EMS ha permitido la obtención de plantas mutantes de la línea *athak5akt1* con una mayor tolerancia a  $Cs^+$ . Esto permitirá en el futuro, identificar esta tercera vía de entrada de  $K^+$  en la planta.

## ABSTRACT

K<sup>+</sup> is an essential element in living plant cells, which can account for 10% of the dry weight of the plant, being considered a macronutrient in plant nutrition. Current and future agriculture must be able to cope with the increasing demand for agricultural products in increasingly adverse climatic conditions, in parallel with minimizing inputs to ensure their profitability. Obtaining and developing crops with high use efficiency of nutrients, as well as more tolerant to different biotic and abiotic stresses are key to achieving this challenge.

The K<sup>+</sup> AtHAK5 transporter and the AKT1 inward rectifier K<sup>+</sup> channel have been described in the model plant *Arabidopsis thaliana* as the main entities for K<sup>+</sup> uptake by the root, the activity of these systems being conditioned by environmental conditions. These K<sup>+</sup> transport systems have been described in other plant species, although in each of them there may be specific functional differences. Under conditions of K<sup>+</sup> deficiency, AtHAK5 is the main system that allows the entry of K<sup>+</sup> to the interior of inside the plant. AtHAK5 is activated by the AtCIPK23/AtCBL1 complex. This Doctoral Thesis demonstrates that, in addition to this complex, other AtCIPK/AtCBL ones can activate this transporter, such as AtCIPK1/AtCBL1, AtCIPK1/AtCBL9 and AtCIPK9/AtCBL1. The in-depth study of this complex signalling network is essential to understand the regulation of K<sup>+</sup> uptake and the mechanisms involved in coping with different stress conditions, something required to develop plants more tolerant to these stresses.

The studies carried out in this Doctoral Thesis on tomato, using KO mutants obtained through CRISPR-Cas, has allowed to demonstrate the role of the SlHAK5 transporter in the nutrition of K<sup>+</sup> in this plant species. SlHAK5 has been shown to be the main entry pathway for K<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> from micromolar concentrations. In addition, it is shown that, SlHAK5 is essential to maintain proper K<sup>+</sup> nutrition under low K<sup>+</sup> supply and the presence saline stress, playing thus this transport system an important role in plant tolerance to salinity. Furthermore, this system seems to play an important role in the fertility of the plant, since it is involved in the absorption of K<sup>+</sup> in the pollen tube during its growth. Studies as the one presented here, on plant species different to the model plant *Arabidopsis*, makes it possible to reveal the differences and similarities that may exist in the function of the K<sup>+</sup> transport systems between species.

This Doctoral Thesis also describes different studies carried out to identify K<sup>+</sup> transport systems different to AtHAK5 and AKT1 involved in root K<sup>+</sup> uptake. For this purpose, the *Arabidopsis* loss of function double mutant for the *AtHAK5* and *AKT1* genes, which reveals a third K<sup>+</sup> entry pathway, different to AKT1 and AtHAK5, has been used. The *athak5akt1* mutant shows a high sensitivity to Cs<sup>+</sup> because of its low discrimination between K<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup>, which suggests that Cs<sup>+</sup> is entering the root through the same system as K<sup>+</sup>. Mutagenesis of the *athak5akt1* line with EMS has allowed obtaining mutant plants with a higher tolerance to

Cs<sup>+</sup>. This may make it possible in the future to identify this third route of entry of K<sup>+</sup> into the plant.

## FINANCIACIÓN

La realización de esta tesis ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- Título del proyecto: Nutrición de K<sup>+</sup> en plantas: identificación de mecanismos de regulación y de nuevos sistemas de absorción de K<sup>+</sup> por la raíz  
Entidad financiadora: Plan Nacional. Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2015-66434-R)  
Presupuesto total: 133.100 Euros  
Duración: 2016-2019  
Investigador principal: Francisco Rubio Muñoz
- Título del proyecto: Obtención de herramientas moleculares para aumentar la absorción de K<sup>+</sup> en las raíces de tomate  
Número de Identificación: 20806/PI/18  
Entidad financiadora Fundación Séneca de la Región de Murcia  
Duración 2019-2021  
Presupuesto total 87. 500 EUROS  
Investigador principal: Francisco Rubio Muñoz
- Título del proyecto: Incremento del use eficiente del K<sup>+</sup> en cultivos: identificación de nuevos sistemas de transporte de K<sup>+</sup> y de redes de regulación fundamentales para la nutrición de K<sup>+</sup> de las plantas.  
Número de identificación PID2019-106649RB-I00  
Entidad Financiadora Plan Nacional Proyectos I+D+i Retos Investigación (RTI)  
Duración 2020-2023  
Presupuesto total 147.000 Euros  
Investigador Principal: Francisco Rubio Muñoz
- Red temática 'Sistemas de Transporte de Sodio y Potasio en Plantas', con referencia BIO2016-81957-REDT, financiada por la Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España.

El firmante de la presente Tesis Doctoral ha disfrutado de un contrato predoctoral del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU), con referencia FPU15/05525, concedido por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Gobierno de España.





## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de Tesis del CEBAS-CSIC, Dr. Francisco Rubio Muñoz y a mi directora de la UMH Dra. María Ángeles Botella Marrero por su supervisión, dirección y apoyo durante estos años.

También hacer extensa mi gratitud a los doctores Vicente Martínez, Francisco García y Rosa Rivero por haber estado siempre dispuestos a ofrecerme su ayuda y colaboración.

Cómo no, a mis compañeros de laboratorio, Dr. Manuel Nieves, Dra. Reyes Ródenas y Jesús Amo por haberme ayudado y enseñado todo lo posible, y de igual modo, a todo el resto de compañeros de trabajo.

Y, sobre todo, gracias a mi familia, a Ángela y a mis amigos.



## ÍNDICE

I - INTRODUCCIÓN .....	37
1.1.    Funciones del potasio.....	37
1.2.    El K <sup>+</sup> en la agricultura .....	40
1.3.    Absorción y transporte de K <sup>+</sup> .....	42
1.4.    Caracterización molecular del transporte del K <sup>+</sup> .....	44
1.4.1.    Canales de K <sup>+</sup> .....	45
1.4.2.    Transportadores de K <sup>+</sup> .....	47
1.4.3.    Señalización por Ca <sup>2+</sup> y complejos CIPK/CBL en respuesta a la deficiencia de K <sup>+</sup> .....	50
1.4.4.    Relevancia fisiológica de <i>AtHAK5</i> , <i>AKT1</i> y otros sistemas de absorción de K <sup>+</sup> .....	54
1.5.    El problema de la salinidad en los cultivos.....	58
1.5.1.    Efectos causados por la salinidad sobre las plantas .....	59
1.5.2.    Mecanismos de tolerancia a la salinidad.....	60
1.5.3.    Relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> como factor clave en la tolerancia a la salinidad .....	61
1.6.    El problema del Cs <sup>+</sup> en la agricultura .....	63
1.6.1.    Toxicidad por Cs <sup>+</sup> .....	64
1.6.2.    Vías de entrada de Cs <sup>+</sup> en la planta .....	65
1.7.    Plantas modelo y de interés agronómico .....	66
1.7.1.    Planta modelo ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L.).....	66
1.7.2.    Planta de interés agronómico ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	67
II - OBJETIVOS.....	73

III - MATERIALES Y MÉTODOS .....	77
3.1.    Materiales .....	77
3.1.1. Material biológico .....	77
3.2. Métodos .....	79
3.2.1. Sistemas de cultivo y condiciones de crecimiento de plantas .....	79
3.2.2. Cruzamiento de líneas de Arabidopsis .....	84
3.2.3. Métodos de transformación.....	88
3.2.4. Medios y condiciones de cultivo de bacterias y levaduras.....	90
3.2.5. Complementación funcional por crecimiento a bajo K <sup>+</sup> de <i>S. cerevisiae</i> en medio sólido.....	93
3.2.6. Manipulación de ácidos nucleicos .....	93
3.2.7. Germinación del polen, elongación del tubo polínico y estimación del contenido interno de K <sup>+</sup> en plantas de tomate.....	102
3.2.8. Mutagénesis de semillas de Arabidopsis con Metilsulfonato de etilo (EMS)	104
3.2.9. Análisis estadístico.....	105
IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
4 1. Capítulo 1: estudio del papel de las proteínas quinasas AtCIPK1 y AtCIPK9 en la activación del transportador de K <sup>+</sup> de alta afinidad AtHAK5.....	109
4.1.1. Identificación de CIPKs capaces de activar AtHAK5 en levadura .....	109
4.1.2. Comprobación de la activación de AtHAK5 por AtCBL9.....	111
4.1.3. Caracterización de la línea mutante <i>atcipk1</i> .....	112
4.1.4. Caracterización de la línea mutante <i>atcipk9</i> .....	120

4.1.5. Relación entre la tasa de absorción de $K^+$ ( $Rb^+$ ) y la translocación de éste a la parte aérea para cada una de las líneas estudiadas .....	124
4.1.6. Niveles de Expresión de los genes <i>AtCIPK1</i> , <i>AtCIPK9</i> y <i>AtCIPK23</i> .....	127
4.1.7. Niveles de expresión de <i>AtHAK5</i> .....	128
4.1.8. Discusión.....	130
4.2. Capítulo 2: estudio del transportador de $K^+$ de alta afinidad de tomate <i>SIHAK5</i> 136	
4.2.1. Absorción de $K^+$ en el rango de la alta afinidad .....	136
4.2.2. Absorción y acumulación de $Cs^+$ en el rango de la alta afinidad.....	141
4.2.3. Absorción de $K^+$ en el rango de la alta afinidad en condiciones de salinidad 144	
3.2.4. Despolarización de la membrana plasmática de las células de la raíz en respuesta a cambios en la concentración de $K^+$ del medio externo.....	149
3.2.5. Producción de frutos y semillas .....	150
3.2.6. Expresión de <i>SIHAK5</i> en distintos órganos de la planta.....	152
3.2.7. Caracterización del polen.....	153
3.2.8. Discusión.....	159
4.3. Capítulo 3: identificación de un sistema de absorción de $K^+$ distinto de <i>AtHAK5</i> y <i>AKT1</i> .....	166
4.3.1. Elección de las condiciones de selección de las semillas mutagenizadas .....	166
4.3.2. Experimentos preliminares de absorción de $Cs^+$ .....	169
4.3.3. Mutagénesis.....	175
4.3.4. Selección de líneas tolerantes .....	176

4.3.5. Experimentos de caracterización de las líneas tolerantes.....	179
4.3.6. Discusión.....	184
V - CONCLUSIONES.....	191
VI – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	195

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

AcK	Acetato de potasio
AcNa	Acetato de sodio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosín difosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
bp	Par(es) de bases
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
cm	Centimetro
Col-0	Arabidopsis thaliana, ecotipo columbia
CT	'Threshold Cycle'
C-t	Dominio C-terminal
°C	Grado Celsius
dNTPs	desoxinucleósidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF-1a	Factor de elongación 1 $\alpha$
EMS	Metil sulfonato de etilo
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
FC	Fold Change'
FT	Factor de Transcripción
g	Gramo
GTE	Glucosa-Tris-EDTA

h	Hora
H	Solución nutritiva Hoagland
H <sup>+</sup>	Hidróxido/ protón
ha	Hectárea
ICP	Espectrofotómetro de iones acoplado a plasma
IL	Dominio 'Internal loop'
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LB	Medio Luria-Broth
LiCl	Cloruro de litio
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
mg	Miligramo
MMha	Millones de hectáreas
Mha	Miles de hectáreas
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMT	Millones de toneladas
MT	Miles de toneladas
mV	Milivoltios
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ion amonio
nM	Nanomolar
NSCC	Canal de cationes no selectivo
PA	Medio Fosfato de Arginina ('Phosphate Arginine')



PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PF	Peso fresco
PE	Polietileno
PLATE	Solución de transformación de levaduras (PEG/Lithium Acetate/Tris/EDTA)
PS	Peso seco
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés, 'Reactive Oxygen Species')
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato sódico
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
Taq	ADN polimerasa, aislada de <i>Thermus aquaticus</i>
T <sub>m</sub>	Temperatura de 'melting'
UA	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
v	Volumen
V <sub>m</sub>	Velocidad máxima
YPD	Medio para crecimiento de levaduras (del inglés, 'Yeast Peptone Dextrose')
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micrómetro
μM	Micromolar
μmol	Micromol



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones del K <sup>+</sup> .....	38
Figura 2. Ciclo del K <sup>+</sup> en el suelo. Fertiberia (2005).....	41
Figura 3. Corte transversal de una raíz en la que se representan las dos posibles vías de absorción de sustancias en las plantas. ....	43
Figura 4. Cinética de absorción de K <sup>+</sup> en raíz de cebada .....	44
Figura 5. Esquema de una de las cuatro subunidades que forman un canal tipo <i>shaker</i> .....	46
Figura 6. Dominios y motivos presentes en las proteínas CBLs y CIPKs...	52
Figura 7. Dianas de interacción de las proteínas CIPKs.....	53
Figura 8. Adquisición de K <sup>+</sup> por la raíz de Arabidopsis. ....	55
Figura 9. Árbol filogenético de la familia de los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGC) en Arabidopsis .....	57
Figura 10. Interconexión entre iones K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> en la percepción de señales externas. ....	63
Figura 11. Roseta de <i>A. thaliana</i> ecotipo Columbia-0.....	66
Figura 12. Planta de <i>Solanum lycopersicum</i> L. var. Micro-Tom .....	69
Figura 13. Sistema empleado para el cultivo hidropónico de Arabidopsis y cámara de cultivo con iluminación, temperatura y humedad controlada .....	81
Figura 14. Equipo para llevar a cabo los registros de potencial eléctrico de membrana en células de raíz de tomate.....	87
Figura 15. Bandeja de PE de 40x60 cm con sustrato para el crecimiento de las semillas mutagenizadas.....	105
Figura 16. Árbol filogenético representativo de la familia AtCIPK junto con imágenes de ensayo de complementación de la levadura por AtHAK5 y las 26	

CIPK de Arabidopsis publicadas en la Tesis doctoral de Reyes Ródenas (Rodenas, 2019) .....	110
Figura 17. Ensayo de complementación en levadura expresando AtHAK5, AtCBL1, AtCBL9, AtCIPK1, AtCIPK9 yAtCIPK23 .....	112
Figura 18. Experimento de absorción de Rb <sup>+</sup> en plantas ayunadas de K <sup>+</sup> (mutante <i>atcipk1</i> ).....	114
Figura 19. Peso seco de la parte aérea (g planta <sup>-1</sup> ) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K <sup>+</sup> .....	115
Figura 20. Peso seco de la raíz (g) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K <sup>+</sup> .....	115
Figura 21. Concentraciones de K <sup>+</sup> de la parte aérea (mmol g PS <sup>-1</sup> ) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K <sup>+</sup> .....	116
Figura 22. Concentraciones de K <sup>+</sup> de la raíz (mmol g PS <sup>-1</sup> ) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K <sup>+</sup> .....	117
Figura 23. Tasa de translocación de Rb <sup>+</sup> a la parte aérea .....	118
Figura 24. Absorción de Rb <sup>+</sup> en plantas ayunadas de K <sup>+</sup> en condiciones de estrés osmótico .....	120
Figura 25. Absorción de Rb <sup>+</sup> en plantas ayunadas de K <sup>+</sup> (mutante <i>atcipk9</i> ).. .....	121
Figura 26. Peso seco de la parte aérea y raíz (g.planta <sup>-1</sup> ) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K <sup>+</sup> .....	122
Figura 27. Concentraciones de K <sup>+</sup> de la parte aérea y de la raíz (mmol g PS <sup>-1</sup> ) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K <sup>+</sup> .. .....	123
Figura 28. Tasa de translocación de Rb <sup>+</sup> a la parte aérea .....	124
Figura 29. Relación entre el porcentaje de Rb <sup>+</sup> en la parte aérea y la tasa de absorción de Rb <sup>+</sup> .....	126

Figura 30. Niveles de expresión de los genes <i>AtCIPK1</i> , <i>AtCIPK9</i> y <i>AtCIPK23</i> en raíces de plantas WT Col-0, <i>atcipk1</i> , <i>atcipk9</i> y <i>atcipk23</i> en respuesta al ayuno de K <sup>+</sup> .....	128
Figura 31. Niveles de expresión del gen <i>AtHAK5</i> en raíces de plantas WT Col-0, <i>atcipk1</i> , <i>atcipk9</i> y <i>atcipk23</i> en respuesta al ayuno de K <sup>+</sup> .....	129
Figura 32. Peso seco de los distintos órganos .....	137
Figura 33. Concentración de K <sup>+</sup> en los distintos órganos de plantas ayunadas y sin ayunar de K <sup>+</sup> .....	138
Figura 34. Tasa de absorción de Rb <sup>+</sup> en plantas sin ayunar de K <sup>+</sup> .....	139
Figura 35. Tasa de absorción de Rb <sup>+</sup> en plantas ayunadas de K <sup>+</sup> .....	140
Figura 36. Tasa de absorción de Rb <sup>+</sup> en plantas <i>slhak5-2</i> ayunadas de K <sup>+</sup> .. .....	141
Figura 37. Tasa de absorción de Cs <sup>+</sup> .....	142
Figura 38. Concentración de Cs <sup>+</sup> (A) y de K <sup>+</sup> (B) en plantas crecidas con 0,3 mM K <sup>+</sup> y 0,02 mM Cs <sup>+</sup> .....	143
Figura 39. Relación K <sup>+</sup> /Cs <sup>+</sup> en plantas crecidas con 0,3 mM K <sup>+</sup> y 0,02 mM Cs <sup>+</sup> .....	144
Figura 40. Peso seco (A) y fotografías (B) de las plantas WT y <i>slhak5-1</i> crecidas con 10 μM de K <sup>+</sup> , con y sin 50 mM NaCl .....	145
Figura 41. Concentración de K <sup>+</sup> de las plantas WT y <i>slhak5-1</i> crecidas en 10 μM de K <sup>+</sup> con y sin 50 mM NaCl .....	147
Figura 42. Concentración de Na <sup>+</sup> de las plantas WT y <i>slhak5-1</i> crecidas en 10 μM de K <sup>+</sup> con y sin 50 mM NaCl (A) y relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> (B) .....	148
Figura 43. Tasa de absorción de Rb <sup>+</sup> en plantas WT y <i>slhak5-1</i> crecidas con 10 μM de K <sup>+</sup> con y sin 50 mM NaCl .....	148
Figura 44. Despolarización de membrana plasmática de células de raíz inducida por K <sup>+</sup> en plantas WT y <i>slhak5-1</i> .....	150
Figura 45. Número de frutos por cosecha de las líneas WT y <i>slhak5-1</i> ..	151

Figura 46. Fotografía de los frutos (A), promedio de peso fresco (B) y número medio de semillas (C) por fruto de plantas WT y <i>slhak5-1</i> .....	152
Figura 47. Nivel de expresión de <i>SIHAK5</i> en diferentes órganos de la planta silvestre.....	153
Figura 48. Imágenes de polen de WT (A) y <i>slhak5-1</i> (B) y porcentajes de germinación del polen (C) .....	155
Figura 49. Longitud del tubo polínico ( $\mu\text{m}$ ) .....	156
Figura 50. Porcentajes de germinación (A) y longitud del tubo polínico ( $\mu\text{m}$ ) (B) en las líneas <i>slhak5-1</i> sin ADN-T y <i>slhak5-2</i> .....	157
Figura 51. Imágenes de los granos de polen y de la fluorescencia debida a IPG-4 en polen de plantas WT y <i>slhak5-1</i> (A), y cuantificación de la fluorescencia (B).....	158
Figura 52. Cuantificación de la fluorescencia debida a IPG-4 en el polen de las líneas WT, <i>slhak5-1</i> sin ADN-T y <i>slhak5-2</i> .....	159
Figura 53. Ensayo de las condiciones de selección de plantas de <i>Arabidopsis</i> tolerantes a $\text{Cs}^+$ y $\text{Ca}^{2+}$ .....	168
Figura 54. Peso seco de parte aérea (A) y raíz (B) de plantas de <i>Arabidopsis</i> con distintos tratamientos de $\text{Cs}^+$ y $\text{K}^+$ .....	170
Figura 55. Concentración de $\text{K}^+$ en parte aérea (A) y raíz (B) en plantas de <i>Arabidopsis</i> con distintos tratamientos de $\text{Cs}^+$ y $\text{K}^+$ .....	171
Figura 56. Concentración de $\text{Cs}^+$ en parte aérea (A) y raíz (B) en plantas de <i>Arabidopsis</i> con distintos tratamientos de $\text{Cs}^+$ y $\text{K}^+$ .....	172
Figura 57. Entrada de $\text{Cs}^+$ en plantas de <i>Arabidopsis</i> con distintos tratamientos de $\text{Cs}^+$ y $\text{K}^+$ . I.....	173
Figura 58. Relación $\text{Cs}^+/\text{K}^+$ de la parte aérea (A) y raíz (B) en plantas de <i>Arabidopsis</i> con distintos tratamientos de $\text{Cs}^+$ y $\text{K}^+$ .....	174
Figura 59. Electroforesis de los productos de PCR de comprobación de las líneas mutantes obtenidas de la mutagénesis con EMS.....	178

Figura 60. Peso seco de la parte aérea (A) y de la raíz (B) de distintas líneas de Arabidopsis crecidas en 0,5 mM de K <sup>+</sup> y 125 μM de Cs <sup>+</sup> .....	180
Figura 61. Concentración de K <sup>+</sup> de la parte aérea (barras negras) y de la raíz (barras grises) de distintas líneas de Arabidopsis crecidas en 0,5 mM de K <sup>+</sup> y 125 μM de Cs <sup>+</sup> .....	181
Figura 62. Concentración de Cs <sup>+</sup> de la parte aérea (barras negras) y de la raíz (barras grises) de distintas líneas de Arabidopsis crecidas en 0,5 mM de K <sup>+</sup> y 125 μM de Cs <sup>+</sup> .....	182
Figura 63. Entrada de Cs <sup>+</sup> en distintas líneas de Arabidopsis crecidas en 0,5 mM de K <sup>+</sup> y 125 μM de Cs <sup>+</sup> .....	183
Figura 64. Relación Cs <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> de la parte aérea (barras negras) y raíz (barras grises) de distintas líneas de Arabidopsis crecidas en 0,5 mM de K <sup>+</sup> y 125 μM de Cs <sup>+</sup> .....	184





## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales productores de tomate a nivel mundial (FAO, 2017). La producción se expresa en millones de toneladas (MMT) y el área cultivada en miles de hectáreas (Mha).....	67
Tabla 2. Regiones españolas productoras de tomate (FAO, 2017). La producción se expresa en miles de toneladas (MT) y el área cultivada en hectáreas (ha).....	68
Tabla 3. Cepas utilizadas. ....	77
Tabla 4. Líneas de <i>Arabidopsis</i> utilizadas. ....	78
Tabla 5. Líneas de tomate utilizadas. ....	78
Tabla 6. Plásmidos empleados para la transformación de <i>S. cerevisiae</i> ...	79
Tabla 7. Composición de la solución 1/5 Hoagland modificada con sus concentraciones finales. ....	83
Tabla 8. Cebadores empleados para la comprobación de las líneas mutantes de <i>Arabidopsis</i> obtenidas mediante cruzamiento .....	85
Tabla 9. Composición de la solución PLATE para transformación de <i>S. cerevisiae</i> .....	89
Tabla 10. Composición medio LB.....	90
Tabla 11. Composición del medio YPD .....	90
Tabla 12. Composición SD.....	91
Tabla 13. Composición medio PA .....	91
Tabla 14. Composición oligoelementos 1000X.....	92
Tabla 15. Composición mezcla vitaminas 100X .....	92
Tabla 16. Composición de la solución I .....	94
Tabla 17. Composición de la solución II .....	94
Tabla 18. Composición tampón GTE.....	95

Tabla 19. Composición tampón TE .....	96
Tabla 20. Composición del tampón de extracción CTAB.....	97
Tabla 21. Reactivos utilizados para la amplificación por PCR de fragmentos de interés .....	98
Tabla 22. Condiciones del termociclador para la amplificación de fragmentos de interés.....	98
Tabla 23. Condiciones para la síntesis de ADN complementario.....	100
Tabla 24. Componentes de la reacción de RT-qPCR .....	101
Tabla 25. Condiciones para amplificación por RT-qPCR.....	101
Tabla 26. Composición del medio de germinación de polen.....	103
Tabla 27. Porcentaje de germinación y de plantas albinas en la M1 para cada uno de los tratamientos de mutagénesis realizados.....	176
Tabla 28. Líneas mutantes seleccionadas en 0,5 mM K <sup>+</sup> + 125 μM Cs <sup>+</sup> y 0 K <sup>+</sup> + 20 mM Ca <sup>2+</sup> .....	176
Tabla 29. Cebadores empleados para la comprobación de la inserción de ADN-T en <i>AtHAK5</i> y <i>AKT1</i> de plantas <i>athak5akt1</i> mutagenizadas tolerantes a Cs <sup>+</sup> .....	177

# I - INTRODUCCIÓN



## I - INTRODUCCIÓN

### 1.1. FUNCIONES DEL POTASIO

Una nutrición adecuada de las plantas requiere al menos de 14 elementos minerales. Todos estos elementos son los que se denominan elementos esenciales (Marschner, 2012), y dependiendo de las cantidades en las que las plantas los requieren, se clasifican en macronutrientes y micronutrientes. El primer grupo lo forman los que se requieren en grandes cantidades y su concentración en el peso seco es inferior o igual al 0,1%, entre los que se encuentran el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), azufre (S) y magnesio (Mg). El grupo de los micronutrientes engloba aquellos elementos esenciales requeridos en menores cantidades y su concentración en el peso seco es menor o igual al 0.01%. Estos son el cloro (Cl), hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn), boro (B), níquel (Ni), zinc (Zn) y molibdeno (Mo).

En los organismos vivos, el potasio se encuentra como ion cargado positivamente ( $K^+$ ). Que el  $K^+$  sea considerado un macronutriente (Leigh and Wyn Jones, 1984) se explica porque sólo este elemento, puede llegar a suponer el 10% del peso seco de la planta, por lo que ésta lo requiere en grandes cantidades a lo largo de su ciclo vegetativo. Las funciones que desempeña son muchas y de vital importancia (Figura 1). Al tratarse de un ion cargado positivamente y ser tan abundante, permite la estabilización de diversas moléculas cargadas negativamente, como, por ejemplo, ácidos nucleicos y proteínas. Además de esto, juega un papel muy importante en el aparato fotosintético, ya que una deficiencia de  $K^+$  produce síntomas de clorosis en hoja, provocados por una disminución en el contenido de clorofilas, afectando negativamente la actividad fotosintética y la translocación de carbono (Pier and Berkowitz, 1987).

Otra de sus funciones del  $K^+$  es la participación en la actividad enzimática del metabolismo de la planta (Figura 1), actuando como cofactor de diferentes reacciones, incrementando la velocidad de reacción catalítica ( $V_{max}$ ) o la afinidad por el sustrato ( $K_m$ ). Se trata de uniones muy selectivas por el ion  $K^+$  y que no pueden ser sustituidos por otros iones como el  $Na^+$  o  $Li^+$  (Marschner, 2012).

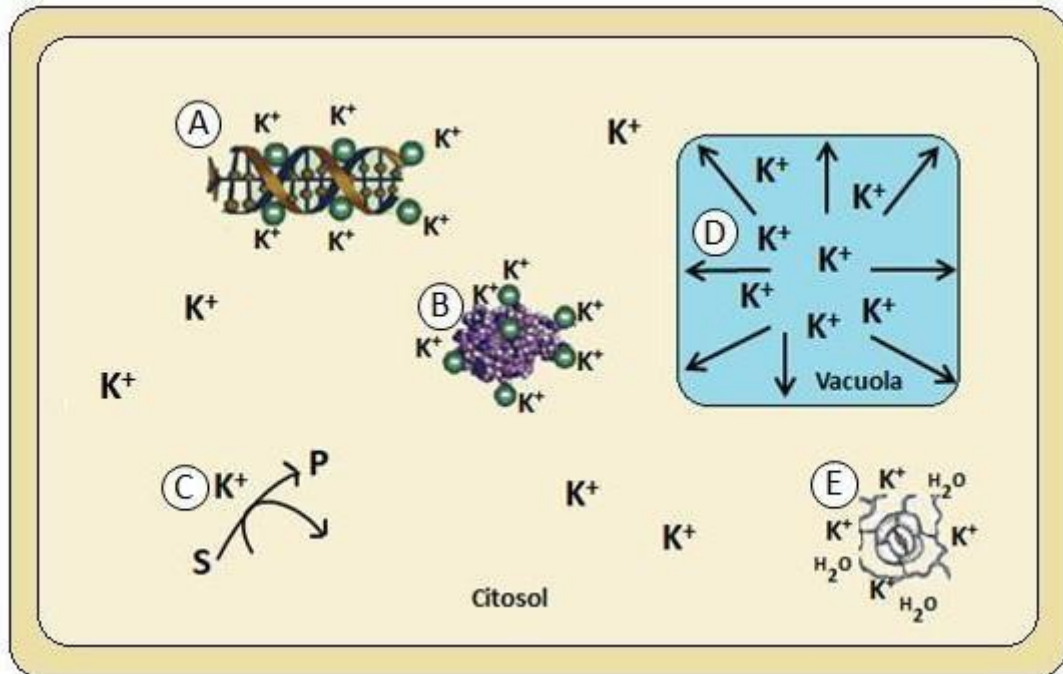


Figura 1. Funciones del K<sup>+</sup>. Estabilización de moléculas cargadas negativamente, ácidos nucleicos (A) y proteínas (B). Activación de enzimas específicas actuando como cofactor (C). Principal catión almacenado en la vacuola (D), responsable del mantenimiento de la estructura celular y expansión de la misma. Regulación de la apertura y cierre de los estomas (E). Modificada de (Maathuis, 2009).

El K<sup>+</sup> es el principal soluto inorgánico osmóticamente activo en el interior de la célula, siendo la concentración citosólica de este elemento próxima a 100 mM (Leigh and Wyn Jones, 1984). Sin embargo, la concentración varía entre los distintos compartimentos celulares. En la vacuola, siendo éste el orgánulo donde se almacena en mayor medida dicho elemento, la concentración puede oscilar entre 10 y 200 mM, mientras que en las células oclusivas de los estomas, esta concentración puede llegar a alcanzar 500 mM. Estas concentraciones son muy variables y dependientes del estado nutricional de la planta. Esta elevada concentración de K<sup>+</sup> en el interior de la célula es responsable de mantener la turgencia celular (Marschner, 2012). La expansión celular, la apertura y cierre de los estomas y la elongación del tubo polínico entre otros, son producidos por los

cambios en la turgencia celular debidos a la alta movilidad que presenta el  $K^+$  en el interior de la planta.

Las plantas toman el  $K^+$  de la solución del suelo a través de las raíces, donde en condiciones de campo suele estar presente en una concentración variable entre 0,1 mM y 1 mM (Maathuis, 2009). Como se puede observar, estas concentraciones de  $K^+$  en el suelo distan mucho de las concentraciones presentes en el interior de la célula vegetal, donde como hemos dicho anteriormente, la concentración citoplasmática de  $K^+$  se encuentra en torno a 100 mM. Esta elevada demanda de  $K^+$  por parte de la planta, se satisface gracias a los eficientes sistemas de absorción desde la solución del suelo y de translocación de este elemento a la parte aérea.

En situaciones de deficiencia de  $K^+$ , las plantas son capaces de poner en funcionamiento diversos mecanismos adaptativos. En primer lugar, se produce la activación de los sistemas implicados en la adquisición y movilización de este nutriente. El  $K^+$  presenta una movilidad muy alta en el interior de las plantas, por lo que es capaz de ser movilizado en grandes cantidades desde la raíz a la parte aérea vía xilema, e incluso en la parte aérea, es movilizado de unas hojas a otras en función de las necesidades (Karley and White, 2009). En segundo lugar, se produce el crecimiento del sistema radicular, tanto de la raíz primaria como laterales, incluyendo un mayor desarrollo de los pelos radiculares (Jung et al., 2009) con el objetivo de explorar una mayor superficie de suelo para la adquisición de  $K^+$ .

Cuando el contenido de  $K^+$  es inferior a  $10 \text{ g kg}^{-1}$  de peso seco en la planta, se produce la aparición de síntomas relacionados con la deficiencia de este elemento en la mayoría de las especies vegetales. El primer síntoma visible de dicha deficiencia es la aparición de zonas cloróticas en las hojas, localizándose en los márgenes y entre los nervios, apareciendo estos síntomas inicialmente en las hojas viejas. En el caso de mantenerse este desequilibrio nutricional durante un tiempo más prolongado, se puede producir la necrosis de zonas de la hoja y en casos extremadamente severos, producir la muerte de los meristemos (Marschner, 2012). Además de estos síntomas, es importante resaltar que, al igual que ocurre con otros nutrientes, las plantas deficientes de  $K^+$  son más susceptibles a los daños producidos por diferentes estreses, tanto bióticos como abióticos (Amtmann et al., 2008).

Debido a las funciones que cumple el  $K^+$  en las plantas, la correcta nutrición de este elemento reviste especial importancia en los sistemas agrícolas. La deficiencia de  $K^+$  en los cultivos es un factor muy determinante en la productividad y la calidad de los mismos. Por ello, las estrategias dirigidas a aumentar la eficiencia en el aprovechamiento de la fertilización potásica de los cultivos, ayudarían a poder mantener unas producciones capaces de satisfacer las necesidades de alimentos, que cada vez son mayores, logrando minimizar los aportes de fertilizantes y sus importantes costes económicos y medioambientales (Rengel and Damon, 2008).

## 1.2. EL $K^+$ EN LA AGRICULTURA

Desde el inicio de la agricultura en el Neolítico, cuando el hombre evolucionó desde la recolección, la caza y la pesca a la agricultura y la ganadería, la demanda de superficie cultivable ha aumentado en la medida que lo ha hecho el número de habitantes en el planeta. En el periodo desde 1961 a 2018, el número de hectáreas cultivadas a nivel mundial ha aumentado un 17%, pasando de los 3.022 millones de hectáreas (ha) a 3.534 Mha (FAO, 2018). Este aumento de la superficie de cultivo ha supuesto la puesta en producción de zonas geográficas poco fértiles y con una baja disponibilidad de nutrientes, por lo que este déficit de nutrientes se ha suplido mediante la aplicación de fertilizantes para conseguir producciones adecuadas. Los beneficios de la utilización de fertilizantes en la agricultura son indiscutibles, sin embargo, supone un coste económico y medioambiental considerable (Galloway et al., 2008; Ju et al., 2009), por lo que es importante la optimización del uso de éstos, con el objetivo de maximizar la eficiencia de la fertilización. El consumo de fertilizantes potásicos a nivel mundial aumentó de 23,3 MMT en 2002 a 37,6 MMT en 2017 (FAO, 2017), lo que supone un incremento del 61% en tan sólo 15 años. Aunque se estima que las reservas globales de minerales son suficientes para abastecer a la agricultura durante cientos o incluso miles de años, la rentabilidad de las explotaciones agrícolas dependerá en gran medida del uso eficiente de los fertilizantes, especialmente en condiciones de estreses o en suelos marginales (Rengel and Damon, 2008).

Como se ha dicho, la solución del suelo es la principal fuente de  $K^+$  para la nutrición mineral de las plantas, tomándolo principalmente a través de las raíces.



En un suelo sin fertilizar, la concentración de  $K^+$  puede suponer aproximadamente el 5% de las necesidades del cultivo. Únicamente el 0,1-0,2 % del  $K^+$  presente en el suelo se encuentra en la solución (Figura 2), es decir, disponible para la planta. Este  $K^+$  de la solución, es repuesto por el  $K^+$  intercambiable presente en la superficie de las arcillas de forma continua, tratándose de un proceso relativamente rápido. El 90-98% del  $K^+$  restante presente en el suelo se encuentra formando parte de la estructura de minerales con alto contenido de este elemento, como mica y feldspatos. El  $K^+$  presente en estos minerales va liberándose y pasando a formar parte de la fracción intercambiable, sin embargo, este es un proceso largo, por lo que, en los cálculos de la fertilidad de un suelo, no se tiene en cuenta la riqueza de estos minerales.

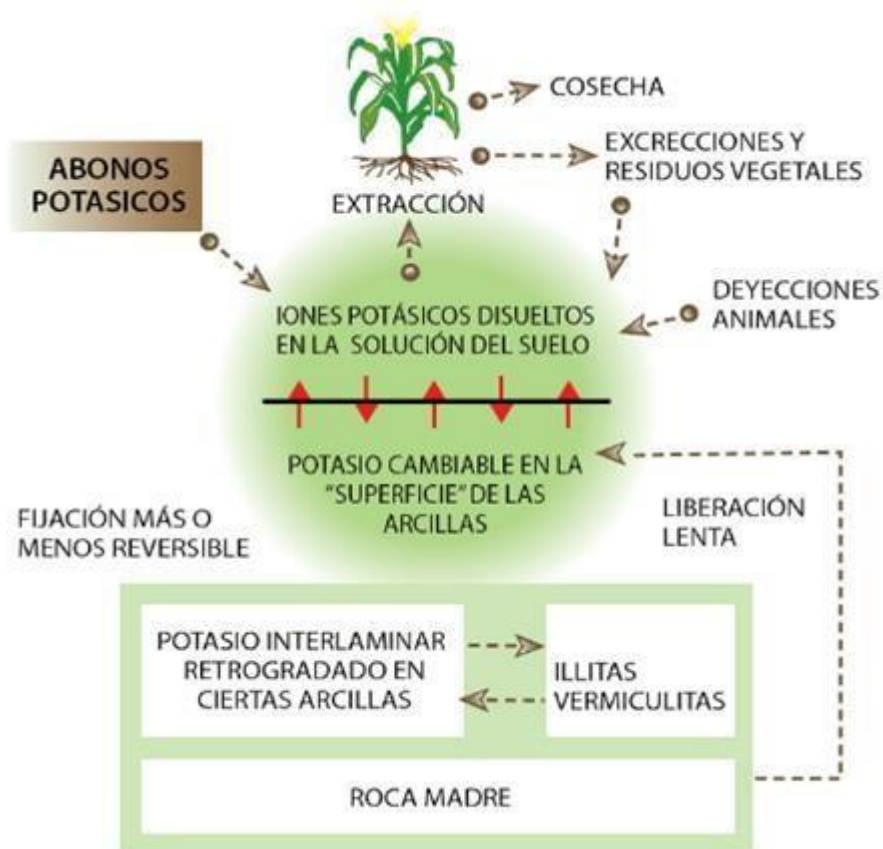


Figura 2. Ciclo del  $K^+$  en el suelo. Fertiberia (2005).

### 1.3. ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE $K^+$

La absorción del  $K^+$  a través de la raíz tiene lugar en los pelos radicales y las células de la epidermis y del córtex. Estas células epidérmicas son estructuras especializadas, que aumentan la superficie de contacto de la raíz con el suelo. Una vez que el  $K^+$  ya ha entrado en contacto con la superficie de la raíz, éste ha de ser transportado hasta los vasos conductores de la estela de la raíz, para ser distribuido al resto de la planta a través de los vasos del xilema o las traqueidas.

Para llegar al xilema, el  $K^+$  puede seguir la vía del apoplasto o del simplasto. (Figura 3). En la vía apoplástica, el  $K^+$  circula libremente por los espacios intercelulares de la raíz y por las paredes celulares. Este movimiento se ve interrumpido cuando llega a la endodermis, donde se encuentra con la banda de Caspary. Esta banda está formada por una capa de suberina impermeable que se extiende a lo largo de la estela de manera ininterrumpida y tiene la función de ejercer una barrera hidrofóbica que limita, por tanto, el paso de  $K^+$  hasta el xilema. La otra vía de entrada es la que se denomina simplástica. En ella, el movimiento del  $K^+$  se produce por el simplasto, es decir, por el interior de los citoplasmas de las células que forman la raíz, a través de las interconexiones existentes entre ellas por los plasmodesmos. Por lo tanto, dada la imposibilidad del  $K^+$  que se mueve por el apoplasto de atravesar la banda de Caspary, la única posible vía de entrada de  $K^+$  a los vasos del xilema es a través del simplasto. Esto significa que, en algún momento, para que el  $K^+$  sea introducido en el simplasto, éste debe atravesar la membrana plasmática de una célula de la epidermis o del córtex, que, al tratarse de una bicapa lipídica, también es impermeable al  $K^+$ . Es en este punto, donde las proteínas transportadoras incluidas en la bicapa lipídica juegan un papel fundamental en la nutrición de las plantas, ya que son éstas las que van a permitir la entrada del  $K^+$  a su interior. El  $K^+$  tiene que atravesar la membrana plasmática, bien en la rizodermis, en cualquier célula del parénquima cortical o en la endodermis. La carga del xilema vuelve a implicar el paso del simplasto al apoplasto, y por lo tanto, también supone el paso a través de una membrana plasmática.

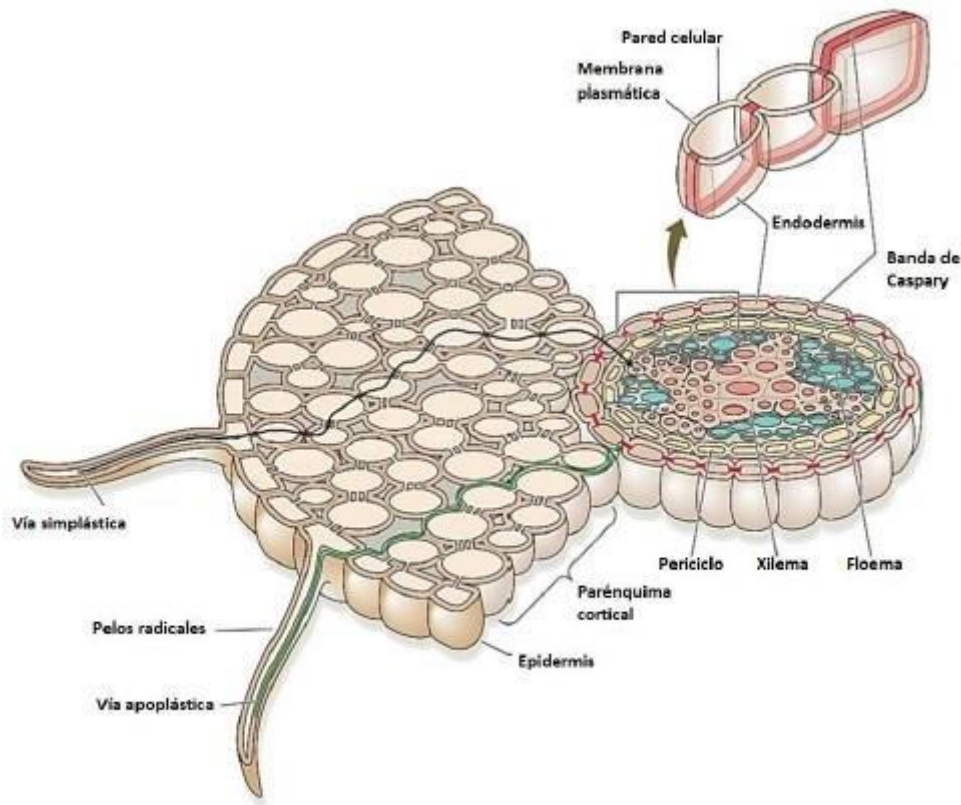


Figura 3. Corte transversal de una raíz en la que se representan las dos posibles vías de absorción de sustancias en las plantas. La mayor parte de los nutrientes y el agua que toma la planta lo hace a través de la vía del apoplasto, atravesando la banda de Caspary (bandas rojas) a través de las membranas celulares de las células de la endodermis. Los nutrientes también pueden llegar al interior de la planta por la vía del simplasto, atravesando la membrana plasmática de las células de la epidermis o el córtex y pasando a las células contiguas a través de los plasmodesmos hasta llegar a los vasos conductores del xilema. Figura modificada de (Taiz, 2006).

A principios de 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 and Hagen, 1952). De esta forma, aplicando el concepto de la cinética enzimática, estudió la absorción de  $K^+$  en raíz de cebada, empleando  $Rb^+$  como análogo al  $K^+$ . Observó que la velocidad de absorción de  $K^+$  mostraba una respuesta bifásica en respuesta al incremento de  $K^+$  en el medio externo (Figura 4) (Epstein et al., 1963). Estos resultados, pusieron de manifiesto

la existencia de, al menos, dos sistemas implicados en la absorción de  $K^+$ . El primero, denominado sistema de alta afinidad, 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, de baja afinidad, mostraba una  $K_m$  por  $K^+$  de 11,4 mM, era saturable y se inhibía por  $Na^+$  (Figura 4) (Epstein et al., 1963). Esta cinética bifásica se ha descrito posteriormente en otras especies vegetales y parece ser un modelo universal.

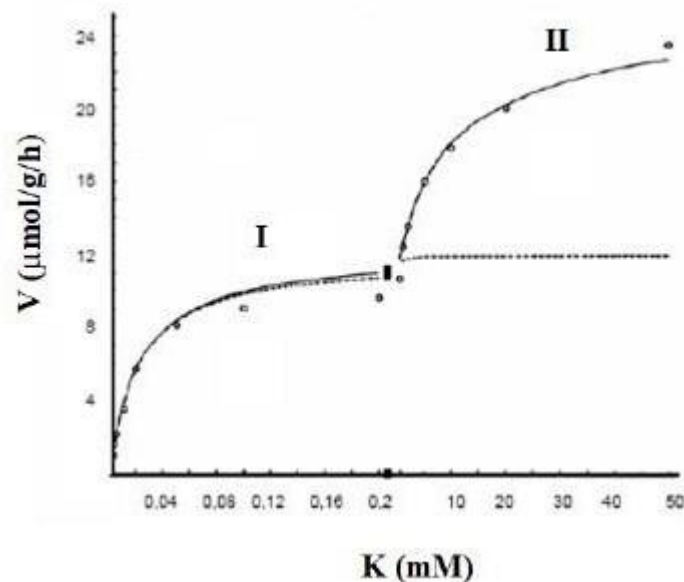


Figura 4. Cinética de absorción de  $K^+$  en raíz de cebada. El primer componente (I) muestra la absorción en el rango micromolar, denominada de alta afinidad; el segundo componente de la curva (II), muestra la absorción predominante en el rango de concentraciones milimolares, denominada de baja afinidad. Modificado de (Epstein et al., 1963).

#### 1.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL TRANSPORTE DEL $K^+$

La identificación y el estudio de los genes implicados en la absorción de  $K^+$  en plantas comenzó en los años 90 del siglo pasado, empleando la complementación funcional en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura posee los genes TRK1 y TRK2, los cuales están implicados en la absorción de  $K^+$ ,

codificando transportadores que median la entrada de  $K^+$  al interior celular desde concentraciones de  $K^+$  en el medio en el rango micromolar. Para los estudios, se emplearon, mutantes de esta levadura que tenían dichos genes interrumpidos.

#### 1.4.1. Canales de $K^+$

En 1992, mediante el empleo de la técnica de complementación funcional en el mutante de levadura *trk1*, se estudió una genoteca de ADNc de *A. thaliana* que permitió el aislamiento de los ADNc de los genes *AKT1* y *KAT1* (Schachtman et al., 1992; Sentenac et al., 1992). Las proteínas que codificaban estos ADNc, mostraron gran homología con los canales de  $K^+$  tipo shaker de *Drosophila melanogaster*. Posteriormente, su expresión en oocitos de *Xenopus laevis* mostró que *KAT1* funcionaba como un canal de  $K^+$  rectificador de entrada, presentando una alta permeabilidad al  $K^+$ , moderada al  $Rb^+$  y baja a  $Cs^+$ ,  $Li^+$  y  $Na^+$ . La expresión en células de insecto mostró que *AKT1* se trataba de una canal de  $K^+$  (Gaymard et al., 1996). Distintos estudios, sugirieron que ambos canales podían participar en el suministro de  $K^+$  a la planta a largo plazo (Gaymard et al., 1996) (Schachtman et al., 1992), por lo que eran buenos candidatos a mediar la entrada de  $K^+$  de baja afinidad observada en las raíces de las plantas.

Años más tarde, se clonaron otros genes que codificaban distintos canales de  $K^+$  en Arabidopsis. De estos canales, se observó que *KAT1* y *KAT2*, junto con el canal rectificador de salida *GORK*, desempeñaban una función en el proceso de apertura y cierre de los estomas. Por otro lado, los canales *SKOR*, encargados de la carga de  $K^+$  en el xilema, mostraron un papel muy importante en la translocación de este elemento desde la raíz a la parte aérea (Lebaudy et al., 2007) (Maser et al., 2001).

En estudios llevados a cabo en líneas de inserción de ADN-T se observó que la pérdida de la función de *AKT1* en *A. thaliana* ecotipo Wassilewskija, mutante *akt1-1*, reducía el crecimiento de la planta a concentraciones de  $K^+$  externo de 10  $\mu$ M (Hirsch et al., 1998). Estos resultados eran muy interesantes porque demostraban que un canal de  $K^+$  podía mediar la entrada de este nutriente en la raíz a concentraciones en las que operaba el sistema de entrada de alta afinidad. Dicha entrada era posible por el potencial de membrana tan negativo que mostraban las células de la raíz del mutante *akt1-1*.

El nivel de transcripción del gen *AKT1* en *Arabidopsis* es independiente de las concentraciones de  $K^+$  en el medio externo (Pilot et al., 2003). Sin embargo, la actividad de este canal se encuentra regulada por fosforilación. En condiciones de estrés por deficiencia de  $K^+$ , tiene lugar una señal de  $Ca^{2+}$  que es detectada por los sensores CBL1 y CBL9 para activar la proteína quinasa CIPK23, produciéndose la fosforilación de AKT1 e incrementando la actividad del canal (Li et al., 2006; Xu et al., 2006; Cheong et al., 2007; Luan, 2009).

Los canales tipo *shaker* (Figura 5) están formados por tetrámeros, pudiendo estar regulada la actividad de AKT1 por su interacción con otras subunidades proteicas, generando proteínas heterotetraméricas que aumentan la diversidad de sus funciones (Lebaudy et al., 2007). Concretamente, AKT1 se encuentra regulado por AtKC1, cuyo gen se encuentra altamente expresado en la raíz (Reintanz et al., 2002), y cuya expresión aumenta en condiciones de ayuno de  $K^+$  (Shin and Schachtman, 2004) y por estrés salino en la parte aérea (Pilot et al., 2003).

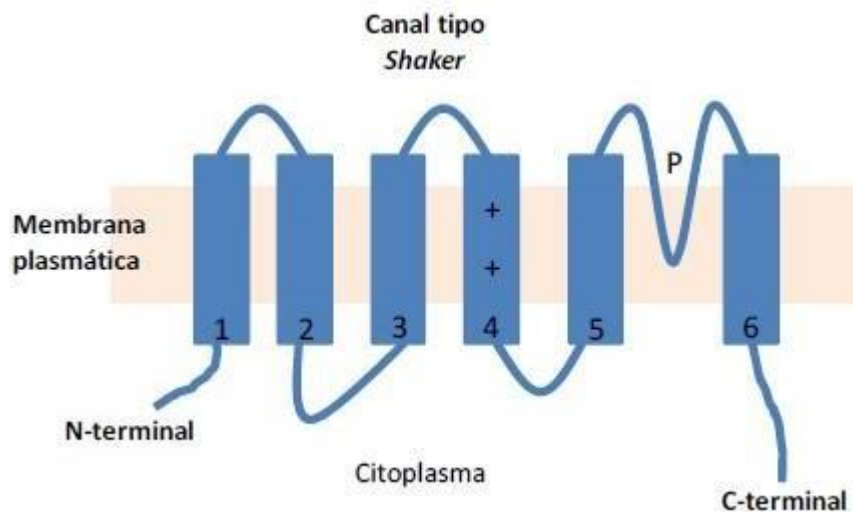


Figura 5. Esquema de una de las cuatro subunidades que forman un canal tipo *shaker*. Este canal consiste en seis segmentos transmembrana siendo el cuarto un sensor de voltaje. Entre el segmento 5 y 6 se encuentra el poro (P), el cual determina la especificidad frente a los iones. Modificado de (Very and Sentenac, 2003).

El tratamiento de las plantas con NaCl durante periodos prolongados de tiempo reduce la expresión de *AKT1* (Kaddour et al., 2009), mientras que cuando los tratamientos con esta sal se realizan durante un corto periodo de tiempo, no muestran un efecto sobre la expresión de este gen (Maathuis et al., 2003). Por otro lado, los equilibrios hormonales también afectan a la expresión de *AKT1* (Pilot et al., 2003). Tratamientos con la citoquinina benziladenina y la auxina 2,4 D, producen una disminución en la expresión de *AKT1* y de su subunidad reguladora *AtKC1*. Sin embargo, en este estudio, se observa que, de entre todos los genes que codifican los canales tipo *shaker*, el transcrito de *AKT1* es el que menos afectado se ve por la aplicación de hormonas exógenas, mientras que *SKOR* es el más sensible, lo cual sugiere que la modulación transcripcional de *AKT1* no es muy importante para su regulación (Alemán et al., 2011).

#### 1.4.2. Transportadores de K<sup>+</sup>

Los genes identificados que codifican transportadores de K<sup>+</sup> en *Arabidopsis* se pueden clasificar en tres familias: HAK/KUP/KT, HKT y antiportadores catión-protón (Maser et al., 2001).

##### 1.4.2.1. Transportadores HAK/KUP/KT

Las proteínas de esta familia pertenecen a la superfamilia de los transportadores APC, del inglés “Amino acid-Polyamine-organocation” y están implicados en el transporte de K<sup>+</sup> a través de membrana en organismos procariotas, hongos y plantas. En las plantas, además de mediar la adquisición y translocación de K<sup>+</sup>, tienen funciones en la adaptación a distintos estreses, regulación del potencial osmótico y el control de la morfología de la raíz. Los primeros transportadores de esta familia en plantas se clonaron en cebada (Santa-María et al., 1997) y *Arabidopsis* (Quintero and Blatt, 1997) (Fu and Luan, 1998; Kim et al., 1998). Años más tarde, la secuenciación de genomas completos de numerosas especies vegetales ha permitido la realización de un estudio filogenético amplio de la familia HAK/KUP/KT con 913 secuencias de 46 genomas de angiospermas (Nieves-Cordones et al., 2016). Este estudio ha permitido identificar distintos grupos filogenéticos y sus relaciones funcionales.

Los estudios realizados de patrones de expresión de los genes que codifican estos transportadores han mostrado que se encuentran presentes en todos los tejidos de la planta (Serrano and Rodriguez-Navarro, 2001; Bañuelos et al., 2002). Del mismo modo, estudios funcionales de los mismos, han mostrado que algunos miembros se encuentran implicados en la adquisición de  $K^+$  a través de la raíz desde la solución del suelo en el rango de operación del sistema de entrada de  $K^+$  de alta afinidad (Gierth and Maser, 2007), mientras que otros lo están en el del rango de la baja afinidad (Fu and Luan, 1998; Vallejo, 2005).

Como se ha dicho anteriormente, los transportadores de esta familia se encuentran en los genomas de numerosas especies vegetales, sin embargo, no en animales (Corratgé-Faillie et al., 2010).

Dentro de la familia HAK/KUP/KT se han identificado miembros que juegan un papel fundamental en la entrada de  $K^+$  de alta afinidad de las plantas. El primer transportador de esta familia identificado en plantas fue el HvHAK1 de cebada (Santa-María et al., 1997). Su expresión en levaduras daba lugar a un transporte de  $K^+$  con las mismas características que el observado en las plantas de cebada. Por ello, se pensó que los transportadores de este tipo podrían ser los implicados en la absorción de  $K^+$  de alta afinidad de las raíces. Posteriormente se identificó en *Arabidopsis* el transportador AtHAK5 (Rubio et al., 2000) homólogo a HvHAK1, y que presentaba características cinéticas del transporte de  $K^+$  similares a HvHAK1. La caracterización de líneas de *Arabidopsis* con inserciones de ADN-T en AtHAK5 permitió demostrar que este tipo de transportadores eran los únicos implicados en la absorción de  $K^+$  a concentraciones en el rango micromolar bajo (Rubio et al., 2008; Rubio et al., 2010). También se identificó el transportador de tomate SlHAK5 (Nieves-Cordones et al., 2008), homólogo a los anteriores. Este transportador de tomate también se expresó en levaduras, donde mediaba absorción de  $K^+$ . Sin embargo, al no existir plantas de tomate con mutaciones nulas para este gen, no se pudo demostrar su función precisa en la absorción de  $K^+$  en las raíces de tomate.

Al igual que el canal rectificador de  $K^+$  AKT1 es activado por los complejos AtCIPK23/AtCBL1-9, se ha observado que el transportador de  $K^+$  AtHAK5, se encuentra regulado por estas mismas proteínas (Ragel et al., 2015). CIPK23 es un regulador central de la absorción de  $K^+$  en plantas, de forma que, la ausencia de



esta proteína da lugar a una disminución de la concentración de  $K^+$  en el interior de la planta, y una disminución de la tasa de absorción de  $K^+$  ( $Rb^+$ ) en condiciones de deficiencia de  $K^+$ . La activación del transportador AtHAK5 por el complejo AtCIPK23/AtCBL1 constituye un mecanismo de regulación postranscripcional, el cual resulta imprescindible para permitir la supervivencia de *Arabidopsis* a concentraciones de  $K^+$  en el medio inferiores a  $10 \mu M$  (Ragel et al., 2015).

#### 1.4.2.2. Transportadores HKT

Los transportadores de la familia de los HKT están implicados en el transporte y el mantenimiento de la homeostasis de  $Na^+$  y  $K^+$ , y han sido identificados gran cantidad de genes pertenecientes a esta familia en diversas especies (Munns and Tester, 2008; Horie et al., 2009; HAUSER and HORIE, 2010). Son diversas las funciones que llevan a cabo, como son la adquisición de  $K^+$  o  $Na^+$ , el control del potencial de membrana, la adaptación al estrés osmótico y salino, la reabsorción del  $Na^+$  desde el xilema y la recirculación de  $Na^+$  desde la parte aérea a las raíces, etc. (Corratgé-Faillie et al., 2010; Haro et al., 2010; Hauser and Horie, 2010).

Debido a que los transportadores de esta familia son todos permeables a  $Na^+$ , los estudios llevados a cabo sobre éstos, se ha centrado principalmente en la adaptación a medios salinos, más que en su papel como transportadores de  $K^+$ .

#### 1.4.2.3. Antiportadores Cación-Protón (CPAs)

Los transportadores incluidos en esta familia se caracterizan por poseer un dominio intercambiador  $Na^+/K^+$ , pudiéndose diferenciar dos grupos dentro de la misma: CPA1, constituida por los transportadores de tipo NHX y SOS; y CPA2, constituida por los transportadores del tipo CHX y KEA.

Los antiportadores CPA funcionan en un modo electroneutro, ajustando los gradientes de concentración de cationes y protones (Gierth and Maser, 2007). Los pertenecientes a la subfamilia CPA1, se caracterizaron como antiportadores  $Na^+/H^+$  intracelulares y de membrana plasmática (Brett et al., 2005), sin embargo, también han sido descritos como transportadores de  $K^+$ , como es el caso de AtNHX1 (Venema et al., 2002). La subfamilia CPA2 en *Arabidopsis* está formada por 28 transportadores CHX y 6 transportadores KEA (Maser et al., 2001).

Algunos de estos miembros pueden codificar transportadores  $K^+/H^+$ , relacionados con el mantenimiento de la homeostasis del  $K^+$  en el desarrollo del grano de polen y la germinación del mismo (Evans et al., 2012).

Por último, los estudios realizados en los transportadores KEA, describen la participación de KEA1 y KEA2 de *Arabidopsis* en el desarrollo temprano de los cloroplastos y de KEA3 en la regulación de la fotosíntesis, mediando el flujo de  $H^+$  desde el lumen del tilacoide al estroma a través del intercambio  $K^+/H^+$ , regulando la fotosíntesis.

#### **1.4.3. Señalización por $Ca^{2+}$ y complejos CIPK/CBL en respuesta a la deficiencia de $K^+$**

Dado que las plantas son organismos sésiles y viven en un ambiente muy cambiante, a lo largo de la evolución han desarrollado diversos mecanismos para hacer frente a los cambios ambientales y a los estreses por los que se ven afectadas. En este estudio, hablaremos de algunos de los mecanismos que presentan las plantas para responder y adaptarse a medios con concentraciones bajas de  $K^+$  en el suelo. La planta se encuentra fijada al suelo por las raíces, por lo que son éstas las que en primer lugar perciben la falta de  $K^+$ . Concretamente, esta señal es percibida por la membrana plasmática de las células de la raíz y posteriormente transmitida al citoplasma.

Seguidamente, se dan lugar una serie de reacciones bioquímicas y fisiológicas que incluyen la respuesta a corto y largo plazo. Las reacciones a corto plazo producen cambios en la expresión de los genes implicados en la absorción de  $K^+$ , sin embargo, cuando la situación de estrés continúa durante un periodo de tiempo más prolongado, se producen cambios metabólicos (Amtmann and Blatt, 2009; Armengaud et al., 2009) y morfológicos (Hodge, 2004) en la planta.

De entre todos los mecanismos que presentan las plantas para hacer frente a estas situaciones de estrés, vamos a centrarnos en la señalización por  $Ca^{2+}$  y los complejos CIPK/CBL en respuesta a la deficiencia de  $K^+$ .

##### *1.4.3.1. Señalización por $Ca^{2+}$*

El  $Ca^{2+}$  es uno de los mensajeros implicados en la señalización celular más importantes en respuesta a estreses (Kudla et al., 2010). En condiciones normales,

la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma celular se encuentra en torno a 200 nM (Bush, 1995), pero esta concentración se puede ver modificada por diferentes estímulos, que provocan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde orgánulos, como el retículo endoplasmático o la vacuola (Bush, 1995; Sanders et al., 1999). Estas modificaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático son puntales, produciéndose la reabsorción del catión tras producirse la respuesta (Zhu, 2016), permitiendo que se pueda controlar la intensidad y la duración de la señal (McAinsh and Hetherington, 1998).

Las NADPH oxidasas de la membrana plasmática producen especies reactivas de oxígeno (ROS) extracelulares que activan los canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (Demidchik and Maathuis, 2007). Unos de estos canales activados por ROS en células de raíz de *Arabidopsis* son los pertenecientes a la familia de las anexinas (Laohavisit et al., 2012) que, junto con proteínas de la familia CNGC y GLR podrían ser los responsables de producir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma (Swarbreck et al., 2013; Zhu, 2016). El proceso de reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene lugar mediante su unión a proteínas en el citoplasma o su retorno mediante transporte activo al espacio apoplástico u orgánulos (Kudla et al., 2010).

El incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es percibido por sensores como las calmodulinas (CaM) (Zielinski, 1998), proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Harmon et al., 2000), proteínas CBL (“Calcineurin B-Like”) (Kudla et al., 1999) u otras proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Reddy, 2001).

En un principio, se consideró la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la señalización de la respuesta de las plantas a la deficiencia de  $\text{K}^+$ , debido a la implicación que existía de los sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  de la familia CBL en la regulación de canales y transportadores de  $\text{K}^+$ . Recientemente, el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta de las plantas a la deficiencia de  $\text{K}^+$  se ha demostrado mediante el empleo de la proteína reportera de  $\text{Ca}^{2+}$  YC3.6 (Costa and Kudla, 2015). En este trabajo se describían dos señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático en respuesta a bajo  $\text{K}^+$  (Behera et al., 2017).

### 1.4.3.2. Complejos CIPK/CBL

El estudio de las proteínas de la familia CBL se ha desarrollado históricamente de forma conjunta con las proteínas SnRK3, conocidas también como CIPKs ('Calcineurin B-like Interacting Protein Kinases'). Los sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  desarrollan una importante función en la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a distintos estreses. Cuando este catión se une a las proteínas, éstas sufren un cambio en su conformación permitiéndoles interactuar y activar sus proteínas diana (Das and Pandey, 2010). Las proteínas CBL presentan un dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  formado por cuatro dominios "EF-hand", y un dominio PFPF, cuyo residuo de serina es fosforilado por las CIPKs (Hashimoto et al., 2012). Las proteínas CIPKs, presentan un dominio quinasa N-terminal donde se encuentra el sitio de unión a ATP y un dominio de activación. Además, cuentan con un dominio C-terminal que contiene motivos NAF de unión a CBLs y PPI, de unión a fosfatasa.

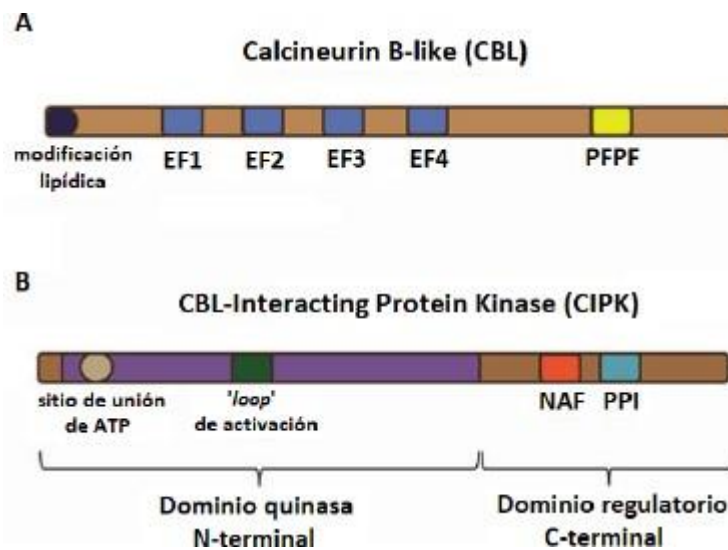


Figura 6. Dominios y motivos presentes en las proteínas CBLs y CIPKs. Las proteínas CBL (A) presentan un dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  formado por cuatro dominios "EF-hand" (cuadrados azules), y un dominio PFPF (cuadrado amarillo), cuyo residuo de serina es fosforilado por las CIPKs. Las proteínas CIPKs, presentan un dominio quinasa N-terminal donde se encuentra el sitio de unión a ATP (círculo marrón) y el de activación (cuadrado verde). Además, cuentan con un dominio C-terminal que contiene motivos NAF de unión a CBLs (cuadrado naranja), y PPI de unión a fosfatasa (cuadrado azul). Figura modificada de (Pandey et al., 2014)

El dominio de activación (“loop” de activación) (Hanks and Hunter, 1995) presente en las proteínas CIPKs cumple la función de región reguladora de la actividad de la quinasa. Contiene entre 1 y 3 residuos que pueden ser fosforilados (serina/treonina/tirosina), los cuales son fundamentales para la activación de la quinasa (Shen and Yen, 2009). La fosforilación provoca el cambio conformacional necesario para que tenga lugar la reacción de catálisis.

Las CBLs se encuentran implicadas en el mecanismo de reclutamiento de las proteínas CIPKs a su sitio de acción mediante modificaciones en su dominio N-terminal (Sánchez-Barrena et al., 2007; Sánchez-Barrena et al., 2013).

En el mecanismo de señalización en respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$ , la proteína CBL se comporta como un sensor y las proteínas CIPKs llevan a cabo la transducción de la señal. Las dianas de las CIPKs pueden ser fosfatasas, transportadores, canales, factores de transcripción y otras enzimas (Figura 7), lo que provoca que este complejo de regulación participe en multitud de procesos biológicos en plantas (Weinl and Kudla, 2009).

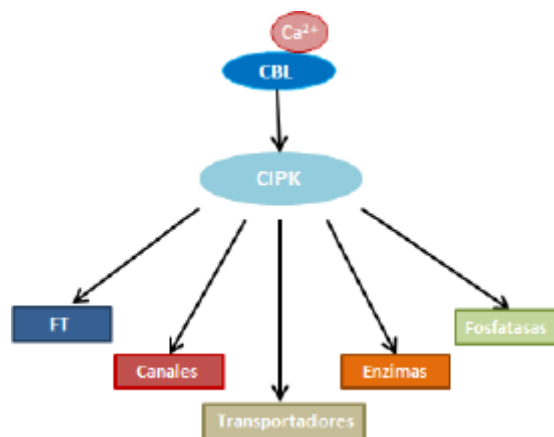


Figura 7. Dianas de interacción de las proteínas CIPKs. Algunas de las proteínas que interaccionan con las CIPKs son los factores de transcripción (FT), canales, transportadores, enzimas y fosfatasas. Figura modificada de (Pandey et al., 2014).

#### 1.4.4. Relevancia fisiológica de *AtHAK5*, *AKT1* y otros sistemas de absorción de K<sup>+</sup>

La utilización de líneas mutantes de inserción de ADN-T y el empleo de inhibidores específicos de canales y transportadores de K<sup>+</sup> en *Arabidopsis*, han permitido conocer la contribución de *AtHAK5* y *AKT1* y de otros sistemas a la absorción de K<sup>+</sup> en la raíz (Gierth et al., 2005; Nieves-Cordones et al., 2010; Pyo et al., 2010; Rubio et al., 2010). Además, la secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis* y la puesta a punto de protocolos altamente eficientes para la transformación de esta especie, han permitido multitud de aproximaciones en el estudio de la función de estos sistemas de transporte de K<sup>+</sup>.

Los estudios en estas líneas de inserción de ADN-T muestran que *AtHAK5* es el único sistema implicado en la absorción de K<sup>+</sup> cuando la concentración del medio externo es inferior a 10  $\mu\text{M}$  (Qi et al., 2008; Nieves-Cordones et al., 2010; Rubio et al., 2010) (Figura 8). Este transportador de alta afinidad permitiría la acumulación de K<sup>+</sup> mediante un simporte con H<sup>+</sup>, como se ha sugerido en estudios in vivo (Maathuis and Sanders, 1994) y este mecanismo de transporte se ha demostrado para su homólogo *DmHAK5* de la especie *Dioanea muscipula* (Scherzer et al., 2015). Cuando las concentraciones de K<sup>+</sup> son mayores, la absorción de este ion se produce también a través de *AKT1*, siendo estos dos sistemas de absorción de K<sup>+</sup> los que en mayor medida contribuyen a la absorción de K<sup>+</sup> cuando las concentraciones oscilan entre 10 y 200  $\mu\text{M}$  (Rubio et al., 2010).

Cuando las concentraciones de K<sup>+</sup> en el medio externo son superiores a 500  $\mu\text{M}$ , la función de *AtHAK5* no es relevante, puesto que la mayor parte de K<sup>+</sup> que absorbe la planta, entra a través de *AKT1* (Rubio et al., 2010). Ensayos con las líneas de *Arabidopsis* mutantes *athak5*, y *akt1*, permitieron demostrar que el transportador *AtHAK5* es sensible a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, mientras que *AKT1* lo es a Ba<sup>2+</sup>.

Estudios posteriores con la línea doble mutante *akt1athak5* demostraron que este mutante no absorbe Rb<sup>+</sup> a concentraciones inferiores a 100  $\mu\text{M}$ , poniendo de manifiesto que *AtHAK5* y *AKT1* son los únicos responsables de la absorción de K<sup>+</sup> en el rango de la alta afinidad (Alemán et al., 2011).

A concentraciones de K<sup>+</sup> superiores de 100  $\mu\text{M}$ , otros sistemas de transporte, todavía no identificados, serían los responsables de la absorción de K<sup>+</sup> en este doble mutante *akt1athak5*. Además, es importante destacar, que la capacidad de

absorción de  $K^+$  de este mutante a estas concentraciones, no es suficiente para permitir un crecimiento adecuado de la planta, puesto que esta línea doble mutante presenta una reducción de su biomasa cuando crece en presencia de  $100 \mu M K^+$ , así como una menor concentración de  $K^+$  en los tejidos de la planta.

Cuando se crecen las plantas *akt1athak5* a concentraciones de  $10 mM$  de  $K^+$  en el medio externo, el desarrollo de las mismas no se ve afectado, presentando el mismo crecimiento que la planta silvestre (Rubio et al., 2010). Esto demuestra que a estas concentraciones de  $K^+$ , otros sistemas de transporte distintos de AtHAK5 y AKT1 son los encargados de introducir el  $K^+$  al interior de la planta.

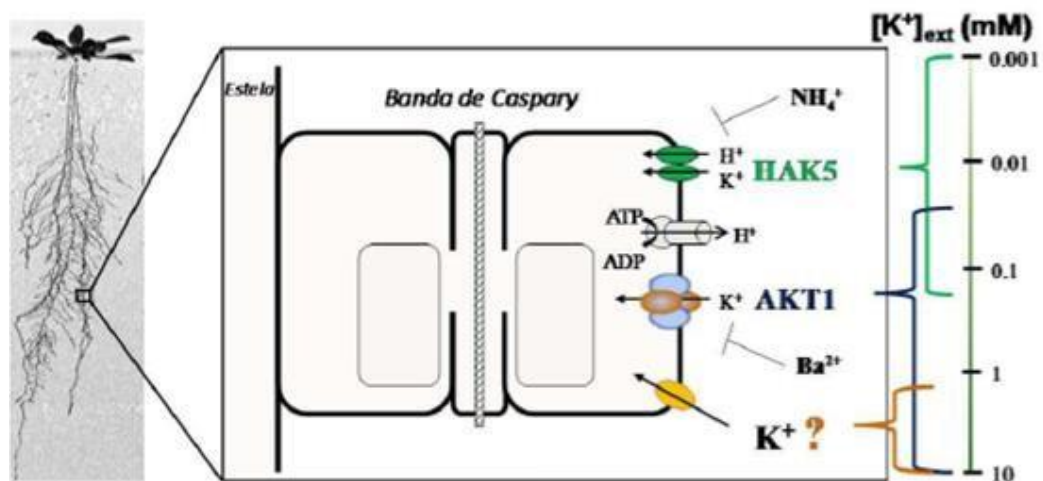


Figura 8. Adquisición de  $K^+$  por la raíz de *Arabidopsis*. Cuando las concentraciones de  $K^+$  son inferiores a  $10 \mu M$ , AtHAK5 es el único sistema implicado en la absorción de  $K^+$ ; cuando las concentraciones son superiores, AKT1 también participa en la adquisición. Así, ambos sistemas, AtHAK5 y AKT1, contribuyen a la absorción de  $K^+$  en paralelo en un rango de concentraciones entre  $50$  y  $200 \mu M$  aproximadamente. A concentraciones superiores a  $500 \mu M$ , AKT1 es el único sistema implicado en la absorción de  $K^+$ . AtHAK5 es sensible a  $NH_4^+$ , mientras que AKT1 lo es a  $Ba^{2+}$ . En ausencia de AtHAK5 y AKT1, otros sistemas todavía sin identificar permiten la absorción de  $K^+$  y el crecimiento de la planta a concentraciones superiores a  $1 mM$ . Figura modificada de (Alemán et al., 2011).

Los sistemas candidatos a mediar la absorción de  $K^+$  en plantas mutantes *akt1athak5* podrían pertenecer a la familia de CHX (Zhao et al., 2008), a la familia de canales no selectivos regulados por nucleótidos cíclicos (Li et al., 2005; Kaplan

et al., 2007), o a la familia de los canales regulados por glutamato (GLR) (Dietrich et al., 2010; White and Karley, 2010).

En la familia de los CHX, existen varios miembros relacionados con el transporte de  $K^+$  en la membrana celular. Un ejemplo de ellos es AtCHX17, que presenta bastantes similitudes con antiportadores  $Na^+$ ,  $K^+-H^+$ , localizados en la membrana plasmática y relacionados con la regulación intracelular de pH, salida de  $K^+$  y control del volumen celular. Todas estas características sugieren que AtCHX17 tenga la función de un antiportador  $Na^+$ ,  $K^+-H^+$  (Cellier et al., 2004). Otro candidato dentro de esta familia podría ser AtCHX13, el cual se localiza en la membrana plasmática y podría tratarse de una vía de entrada de  $K^+$  en la raíz, ya que da lugar a complementación funcional en levadura, mediando la absorción de  $K^+$  con una  $K_m$  para el mismo de 136  $\mu M$  (Zhao et al., 2008). Sin embargo, la alta sensibilidad a  $Cs^+$  y  $Na^+$  del AtCHX13 resta peso a esta teoría, ya que la absorción de  $K^+$  por la raíz no muestra sensibilidad a estos inhibidores (Rubio et al., 2010). Por otro lado, en el doble mutante *akt1athak5* no se observa un sistema de absorción de  $K^+$  con una  $K_m$  de 136  $\mu M$  (Rubio et al., 2010). Además, únicamente se produce expresión de *AtCHX13* en el ápice de la raíz, lo que no permitiría un suministro de  $K^+$  suficiente para explicar el crecimiento de las plantas doble mutante *akt1athak5* a concentraciones de alto  $K^+$ .

En cuanto a la familia de canales regulados por nucleótido cíclicos (CNGCs) se han identificado 20 miembros de esta familia en *Arabidopsis* (Figura 9) (Maser et al., 2001). Sin embargo, la función de estos sistemas no está del todo clara. Diversos estudios han sugerido que los genes CNGC codifican canales no selectivos que se encargan de controlar las corrientes de cationes (Demidchik et al., 2002; Very and Sentenac, 2002; Demidchik and Maathuis, 2007), pudiendo estar implicados en la absorción y translocación de iones (Li et al., 2005). Los genes que codifican algunos canales de esta familia como *AtCNGC1*, *AtCNGC3* y *AtCNGC13* muestran una mayor expresión si la planta está sometida a concentraciones de 150 mM de NaCl, mientras que *AtCNGC7* y *AtCNGC16* muestran una menor expresión en estas condiciones (Maathuis et al., 2003). Estos resultados sugieren que estos sistemas podrían jugar un papel en la adaptación a los ambientes salinos. *AtCNGC1* y *AtCNGC4* pueden transportar cationes como  $Na^+$  o  $K^+$  (Balagué et al., 2003). Otros miembros de esta familia cumplen funciones



en la tolerancia a distintos patógenos, así como en el crecimiento polarizado del tubo polínico. AtCNGC10 se encuentra localizado en la membrana plasmática de diversas partes de la planta, expresándose en mayor medida en la raíz (Christopher et al., 2007). Este canal tiene la capacidad de mediar corrientes catiónicas en la membrana plasmática en ambos sentidos en células HEK293 (Christopher et al., 2007), transportando tanto  $K^+$  como  $Na^+$  y rescatando parcialmente la línea mutante *akt1* (Kaplan et al., 2007). Los resultados obtenidos con líneas antisentido de este canal, que muestran una menor expresión de *AtCNGC10* que las plantas silvestres, sugieren un papel de este canal en el mantenimiento de la homeostasis  $Na^+/K^+$  de la raíz (Guo et al., 2008). Estudios posteriores han demostrado una posible relación de este canal con el transporte interno de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , que, a su vez, regula la actividad de transportadores de  $K^+$  (Guo et al., 2010). Para AtCNGC3 se han obtenido resultados similares, puesto que la mutación de este canal, afecta tanto a los sistemas de absorción de  $K^+$  como de  $Na^+$  a corto plazo en condiciones de alto  $K^+$  externo, lo que sugiere que este sistema puede estar absorbiendo de forma no selectiva cationes monovalentes a nivel de la membrana plasmática (Gobert et al., 2006).

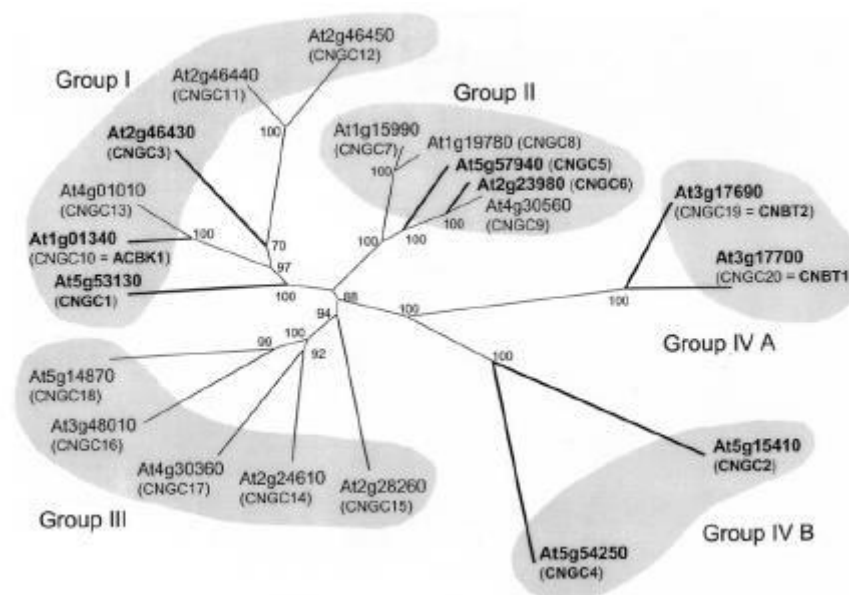


Figura 9. Árbol filogenético de la familia de los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGC) en Arabidopsis. Tomado de (Maser et al., 2001)

Por último, encontramos la familia de los canales regulados por glutamato (GLR). El glutamato, muestra un amplio rango de funciones biológicas debido a sus propiedades bioquímicas. Funciona como metabolito, fuente de energía y nutriente, determina la estructura proteica y actúa como molécula señalizadora (Forde and Lea, 2007). En estudios electrofisiológicos con parches de membrana ("patch-clamp") realizados en protoplastos de raíz se ha observado una activación instantánea de corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de glutamato, identificando células corticales y epidérmicas de la raíz como las responsables de la sensibilidad a éste (Demidchik, 2004). Además, se han hallado evidencias de que los receptores de glutamato en plantas podrían actuar como canales no selectivos de cationes. AtGLR1.1 y AtGLR1.4 presentan dominios que conforman poros permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Tapken and Hollmann, 2008). Los canales GLR podrían considerarse como posibles responsables de la absorción de  $\text{K}^+$  por la raíz puesto que alguno de los miembros que forman esta familia se expresan en la raíz, y junto con los CNGCs, constituyen canales de cationes independientes de voltaje en plantas (White and Karley, 2010). Los GLR, al igual que los CNGCs, permiten un transporte no selectivo de iones, incluyendo el de  $\text{K}^+$  en las células radiculares, manteniendo la homeostasis citosólica del  $\text{Ca}^{2+}$  y regulando su señalización (Demidchik and Maathuis, 2007)

#### 1.5. EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD EN LOS CULTIVOS

La salinidad es uno de los factores que más negativamente afectan al rendimiento y la calidad de los cultivos, siendo uno de los estreses abióticos más comunes en muchas zonas del planeta (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2001; Aktas et al., 2005). Este tipo de estrés, es especialmente acusado en zonas áridas y semiáridas, donde la escasez de recursos hídricos obliga a la utilización de aguas de baja calidad para el riego de los cultivos. El empleo de estas aguas con alto contenido en sales, principalmente cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ) (Tavakkoli et al., 2011), sumado a las altas tasas de evapotranspiración de esas zonas, provoca la acumulación de las sales en el suelo. Se estima que, a nivel mundial, la superficie de suelos afectados por algún tipo de salinidad es de más de 800 MM ha (Rengasamy, 2010), lo que supone aproximadamente un 5% de la superficie del planeta. Estos datos evidencian la magnitud del problema que existe con la

salinidad y los graves perjuicios medioambientales y económicos que esto produce, estimándose unas pérdidas anuales de 11000 millones de dólares (Munns and Tester, 2008).

### 1.5.1. Efectos causados por la salinidad sobre las plantas

Los iones que contribuyen a la salinidad de los suelos, son principalmente  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y es la sal  $\text{NaCl}$  la más abundante. Cuando las sales se disuelven en la fase acuosa del suelo, son dos los posibles efectos que producen sobre las plantas: efecto osmótico y efecto específico.

El efecto osmótico de la salinidad es provocado por una disminución del potencial hídrico del suelo que dificulta la entrada de agua al interior de la planta. El agua del suelo, es transportada hacia los vasos conductores del xilema por la vía simplástica y apoplástica. Esta entrada depende de la diferencia entre el potencial hídrico del suelo y el de la planta, de forma que, si ambos potenciales se igualan debido a una disminución del potencial hídrico de la solución del suelo causada por un aumento de la salinidad del mismo, la entrada de agua cesará. Aunque la vía apoplástica no se encuentra directamente afectada por el medio salino, y es capaz de seguir mediando la entrada de agua, sí depende de la transpiración. Sin embargo, en condiciones de estrés salino, la planta tiende a cerrar los estomas para minimizar la pérdida de agua por transpiración. Por ello, la entrada de agua vía apoplasto también se ve limitada. Esta situación de disminución en la entrada de agua, conlleva la pérdida de turgencia celular, ralentizando el crecimiento y produciendo el marchitamiento de la planta.

El efecto específico está relacionado con la toxicidad que puede provocar la acumulación excesiva de ciertos iones en los tejidos vegetales, lo que da lugar a desequilibrios nutricionales y estrés oxidativo. El cloruro sódico se disocia en iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , que son habitualmente los principales causantes de toxicidad.

El exceso de sales en el suelo también conlleva la aparición de deficiencias nutricionales debido a la competencia que se produce entre los iones presentes en la solución (Pasternak, 1987). Asimismo, la aparición del estrés oxidativo en estas circunstancias provoca una disminución de la tasa fotosintética, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la puesta en marcha de sistemas enzimáticos encargados de neutralizar las anteriores, como la

superóxidodismutasa, ascorbatoperoxidasa y catalasa (Apel and Hirt, 2004; Munns and Tester, 2008).

### 1.5.2. Mecanismos de tolerancia a la salinidad

Munns (2015) (Munns and Gilliam, 2015) señala que las plantas se pueden clasificar en dos grupos diferentes, halófitas y glicófitas en función de su comportamiento en bajo condiciones de salinidad.

Las plantas halófitas son capaces de soportar altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y se desarrollan en hábitats salinos. Este tipo de plantas, presentan una presión osmótica elevada en el citoplasma celular. Dentro de las plantas halófitas se pueden hacer diferentes subgrupos en función de los mecanismos que emplean para sobrevivir al medio salino. Las euhalófitas, acumulan las sales en sus tejidos más tolerantes, vacuola principalmente (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2003); las crinohalófitas, poseen glándulas excretoras que les permiten deshacerse de las sales; las glicohalófitas, poseen raíces con una alta selectividad que impiden la entrada de sales; y las localhalófitas, movilizan las sales a los tejidos senescentes con el fin de eliminarlas.

Las plantas glicófitas no toleran la presencia de altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  en el medio, desarrollándose, por tanto, en hábitats no salinos. Este tipo de plantas siempre presentan una menor concentración de  $\text{Na}^+$  en el interior celular que en la solución del medio, por lo que llevan a cabo una exclusión del ion (Davenport et al., 2005). La sensibilidad a las sales de este tipo de plantas está determinada por su deficiente capacidad de osmorregulación, provocada por una insuficiente absorción de otros iones o la imposibilidad de síntesis de solutos orgánicos compatibles; o por la toxicidad que genera el exceso de iones en el interior celular al no ser adecuadamente compartimentalizados en orgánulos específicos para ello. Las plantas glicófitas se pueden diferenciar de forma general en función de su grado de tolerancia a la salinidad, existiendo diferencias entre géneros y especies dentro de una misma familia. Estas diferencias parecen estar relacionadas con las condiciones particulares de clima y suelo del lugar de origen de dichas plantas. Un ejemplo de esto se puede observar en el mayor grado de tolerancia a la salinidad que presenta la familia Poaceae en comparación con la Leguminosae, explicándose en gran medida dichas diferencias, en que el centro

de origen de las primeras lo constituyen las zonas áridas del sur de África y del sureste de Asia, las cuales se caracterizan por presentar grandes extensiones de suelos salinizados. El cultivo de especies de esta familia durante el proceso de domesticación del cultivo durante siglos, podría haber permitido la adaptación de dichas especies mediante selección natural. Por el contrario, en la familia de las leguminosas, el proceso histórico de adaptación tuvo lugar en otras condiciones, en regiones con menor estrés hídrico y con suelos no salinizados, como es el caso de las regiones montañosas del noroeste y la parte central de Asia y las montañas del centro de África.

Sin embargo, existen excepciones que no nos permiten generalizar y atribuir unos mecanismos de tolerancia a la salinidad determinados únicamente a un grupo u otro de plantas. Un ejemplo de ello es la caña de azúcar, aunque se trata de una especie glicófita, emplea el mecanismo de inclusión de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  para aumentar su tolerancia a la salinidad, de un modo similar a como lo hacen las halófitas. En el caso de la cebada, también ocurre un proceso de inclusión de  $\text{Na}^+$  como respuesta a un estrés salino (Marschner, 1995).

### 1.5.3. Relación $\text{K}^+/\text{Na}^+$ como factor clave en la tolerancia a la salinidad

Una parte importante de la toxicidad por  $\text{Na}^+$  intracelular es consecuencia del desplazamiento del  $\text{K}^+$  en sus funciones como catalizador y activador de la síntesis proteica. Por ello, no sólo es importante la cantidad de  $\text{Na}^+$  presente en la célula, sino también, la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de la misma, ya que esta proporción va a determinar la capacidad de la célula para mantener su metabolismo. Esta relación, ha sido nombrada en reiteradas ocasiones como un factor clave en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Gorham et al., 1991; Maathuis and Amtmann, 1999; Cuin et al., 2003; Colmer et al., 2006). Todo esto, nos permite pensar que, para aumentar la tolerancia de las plantas al estrés salino, se debe conseguir, no sólo disminuir la acumulación de  $\text{Na}^+$  en los tejidos, sino también, aumentar la absorción de  $\text{K}^+$  en condiciones salinas, de forma que la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  sea más favorable (Shabala and Cuin, 2008; Rubio et al., 2010).

La regulación de la actividad de los transportadores de  $\text{K}^+$  puede ser determinante en condiciones de estrés salino. Tanto la deficiencia de  $\text{K}^+$  como una elevada concentración de  $\text{Na}^+$ , pueden producir desequilibrios en la concentración

de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, afectando negativamente a las complejas redes de señalización que tienen lugar en condiciones de estrés. Una de estas redes que comparten la deficiencia de  $\text{K}^+$  y la salinidad es la de las CBLs, mencionadas anteriormente, las cuales interactúan con las proteínas quinasas CIPKs. El sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  CBL1/9 interactúa con CIPK23, regulando la actividad del canal de entrada  $\text{K}^+$  AKT1 (Figura 10). En condiciones de estrés salino, el complejo SOS2/SOS3 fosforila el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática SOS1 activando la salida de  $\text{Na}^+$  del interior celular (Luan, 2009). Estos tres genes implicados en la tolerancia a la salinidad, están también relacionados en la respuesta a bajo  $\text{K}^+$  (Liu and Zhu, 1998).

Por todo lo dicho, se puede concluir, que el estudio de la nutrición del  $\text{K}^+$  en condiciones salinas, junto con los transportadores de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , los cuales son determinantes en la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  citoplasmática, son claves para entender el funcionamiento de los mecanismos implicados en la tolerancia a la salinidad de las plantas. De este modo, el estudio de estos sistemas en plantas con diferentes niveles de tolerancia a la salinidad puede ayudar a la identificación de determinantes genéticos que mejoren esta relación (Amtmann et al., 2004).

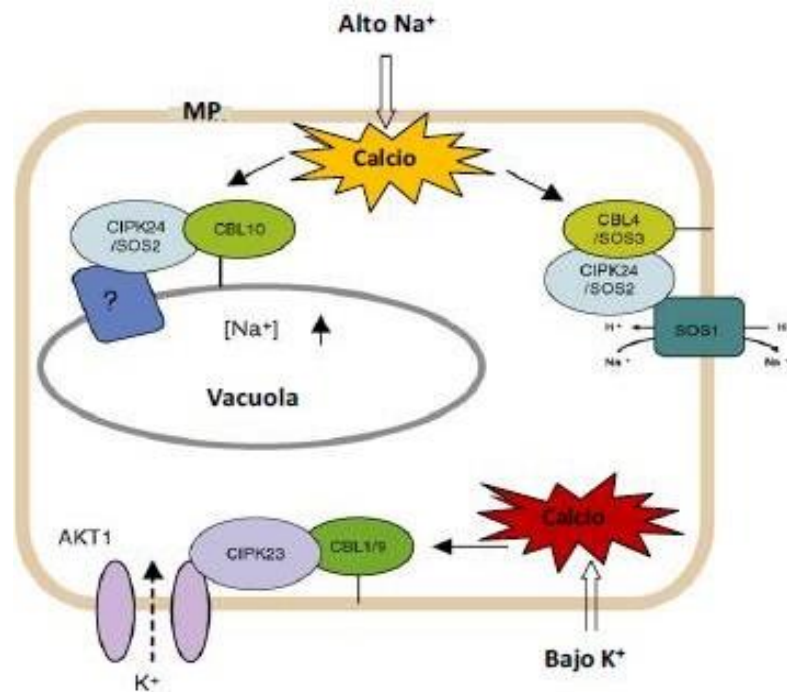


Figura 10. Interconexión entre iones  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  en la percepción de señales externas. Tanto el estrés salino como la deficiencia de  $K^+$ , provocan una señal de  $Ca^{2+}$  que activa a los sensores CBL. Éstos interactúan con diferentes proteínas quinasas de la familia de las CIPKs, fosforilando transportadores de  $Na^+$  y  $K^+$ , manteniendo concentraciones adecuadas de estos cationes en condiciones adversas. Tomado de (Luan, 2009).

#### 1.6. EL PROBLEMA DEL $Cs^+$ EN LA AGRICULTURA

El  $Cs^+$  no suele ser un problema para los cultivos, salvo en ciertas zonas que contienen una alta proporción de minerales de polucita ricos en carbono, como es el caso de los suelos que se encuentran en el sureste de Manitoba (Canadá). Otro motivo causante de contaminación por  $Cs^+$  son las actividades llevadas a cabo por el hombre que han provocado la contaminación de tierras cultivables, como por ejemplo en las zonas cercanas a explotaciones mineras. Sin embargo, el problema más importante relacionado con la presencia de  $Cs^+$  en la agricultura se deriva de la acumulación de isótopos de este catión como consecuencia de accidentes nucleares. Dos casos claros son los accidentes en centrales nucleares que se produjeron en Chernobyl en el año 1986 y en Fukushima en 2011. Estos desastres medioambientales, ocasionaron la contaminación de zonas muy extensas durante

periodos de tiempo muy largos, pudiendo comprometer la utilización de los suelos contaminados. Por poner el ejemplo de Fukushima, la emisión de isótopos radioactivos que tuvo lugar de  $^{134}\text{Cs}$  tiene una vida media de 2 años, mientras que el  $^{137}\text{Cs}$  presenta una vida media de 30 años, y se estima que este accidente haya contaminado aproximadamente la mitad de los suelos de Japón (Yasunari et al., 2011). El  $\text{Cs}^+$  presente en estos suelos es absorbido a través de las raíces de las plantas y translocado al resto de la planta (Fujiwara, 2013). En la zona de Fukushima, el cultivo predominante es el arroz, destinando el grano para consumo humano y la paja para el ganado, con el problema que supone la entrada de este elemento en la cadena alimentaria y su bioacumulación. Tras el accidente de 2011, el problema del  $\text{Cs}^+$  en la agricultura se ha convertido en una preocupación importante para las autoridades del país, además de para los agricultores del mismo.

El  $\text{Cs}^+$  es un metal alcalino del grupo I, por lo que presenta propiedades químicas semejantes a las del  $\text{K}^+$ . Este elemento puede resultar tóxico para las plantas cuando se encuentra en el medio a altas concentraciones, en el rango milimolar. Sin embargo, en los suelos contaminados se encuentra a concentraciones muy inferiores, en el rango micromolar (White and Broadley, 2000). Estas concentraciones, aunque no suponen un problema para las plantas, el consumo de las mismas da lugar a la entrada de  $\text{Cs}^+$  en la cadena trófica y la bioacumulación en animales y humanos. Los iones de  $\text{Cs}^+$  son fuertemente retenidos por el suelo, encontrándose principalmente en la capa superficial del mismo, a una profundidad entre 0-5 cm (Lepage et al., 2015).

### 1.6.1. Toxicidad por $\text{Cs}^+$

Como se ha dicho anteriormente, el  $\text{Cs}^+$  comparte propiedades químicas muy similares a las del  $\text{K}^+$  y compite con él por los sitios de unión de cationes en las proteínas (Avery, 1995). El  $\text{Cs}^+$  provoca la inhibición de reacciones enzimáticas activadas por el  $\text{K}^+$  (Avery, 1995), resultando potencialmente tóxico para las plantas a altas concentraciones. Además, el  $\text{Cs}^+$  también inhibe los canales de  $\text{K}^+$  de la membrana plasmática en células vegetales (White, 1997; White and Broadley, 2000), como por ejemplo AKT1. Un exceso de  $\text{Cs}^+$  en el medio de cultivo, podría inducir déficit de  $\text{K}^+$  en las plantas, aunque los síntomas por



intoxicación debido a  $\text{Cs}^+$ , pueden revertirse parcialmente aumentando la concentración de  $\text{K}^+$  en el medio.

### 1.6.2. Vías de entrada de $\text{Cs}^+$ en la planta

Las plantas toman el  $\text{Cs}^+$  de la solución a través de las raíces y es transportado vía xilema al resto de la planta. Los primeros datos que demuestran que las plantas acumulan  $\text{Cs}^+$  a través de los mecanismos de entrada de  $\text{K}^+$  datan de 1941 (Collander, 1941). En plantas con  $\text{K}^+$  suficiente, la entrada de este catión se produce a través de canales de cationes independientes de voltaje (VICC) (White and Broadley, 2000). Además, en *Arabidopsis*, se propuso que algunos miembros de los CNGC, que podrían constituir canales de cationes independientes de voltaje (VICC), como CNGC1, CNGC2, CNGC4, CNGC10, forman canales que permitirían la entrada tanto de  $\text{K}^+$  como de  $\text{Cs}^+$  (Li et al., 2005; Kanter et al., 2010). Por todo lo expuesto, la toxicidad por  $\text{Cs}^+$  podría estar relacionada con el cociente  $\text{Cs}^+/\text{K}^+$  en la planta (Hampton et al., 2004), lo cual es consistente con los estudios previos realizados en los que se demuestra la competencia entre  $\text{Cs}^+$  y  $\text{K}^+$  por los mismos sitios de unión en proteínas esenciales activadas por  $\text{K}^+$  (Avery, 1995).

El transportador AtHAK5 es uno de los responsables de la entrada de  $\text{Cs}^+$  a la planta especialmente en condiciones de deficiencia de  $\text{K}^+$  (Qi et al., 2008). Otro transportador de  $\text{K}^+$ , en este caso AtKUP9 de *Arabidopsis*, también transporta  $\text{Cs}^+$  cuando se expresaba en un mutante de *E. coli* deficiente en los sistemas endógenos de transporte de  $\text{K}^+$  (Kobayashi et al., 2010).

En condiciones de  $\text{K}^+$  suficiente, los ensayos con plantas *athak5* y *akt1* muestran que la entrada de  $\text{Cs}^+$  tiene lugar a través de un sistema distinto de AtHAK5 (Caballero et al., 2012). Esta entrada de  $\text{Cs}^+$  es inhibida fuertemente por  $\text{Ca}^{2+}$  lo que sugiere que dicha entrada podría estar mediada por un canal no selectivo independiente de voltaje, ya que estos canales son altamente sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ . La participación de este tipo de canales en la entrada de  $\text{Cs}^+$  ha sido sugerido anteriormente (Broadley et al., 2001; Demidchik and Tester, 2002).

## 1.7. PLANTAS MODELO Y DE INTERÉS AGRONÓMICO

### 1.7.1. Planta modelo (*Arabidopsis thaliana* L.)

Parte de este trabajo se ha enfocado en el estudio de líneas mutantes de *A. thaliana* (Figura 11). Esta planta, que fue descrita por primera vez en 1570 por el médico y botánico alemán Johannes Thal, se ha empleado como modelo genético de plantas vasculares y ha sido de gran utilidad para la identificación de genes y el conocimiento de las funciones biológicas que desempeñan los mismos. Las características de esta especie que hicieron que se empezase a emplear como planta modelo fueron su pequeño tamaño, que hace posible su cultivo a gran escala y en espacios reducidos, un ciclo vital corto de entre 6-8 semanas, su genoma diploide y autogamia (flores autofértiles) (Meyerowitz, 2001). Esta especie, además, presenta una gran facilidad para introducir genes exógenos, siendo su transformación rápida y eficiente, lo que favoreció su empleo para el desarrollo de estudios genéticos y moleculares. Otra ventaja muy importante de esta planta es el pequeño tamaño de su genoma, que, al estar totalmente secuenciado, permite desarrollar numerosas técnicas para el estudio de la función génica. La base de datos más utilizada actualmente por los investigadores que trabajan con esta planta modelo es The Arabidopsis Information Resource (TAIR; (Berardini et al., 2015)).



Figura 11. Roseta de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0.

### 1.7.2. Planta de interés agronómico (*Solanum lycopersicum* L.)

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es la segunda hortaliza más cultivada del planeta por detrás de la patata (Calvo-Polanco et al., 2016) siendo el cultivo con mayor valor económico. Esta especie es originaria de la región andina, la que hoy forman los países de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, donde crece de forma silvestre

Según los datos que recoge la Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y Alimentación (FAO), los tres países con mayor producción de este cultivo a nivel mundial son China, India y Turquía (FAO, 2017). En la **Tabla 1** se recogen los principales productores de tomate a nivel mundial con la producción y la superficie cultivada por cada país.

Tabla 1. Principales productores de tomate a nivel mundial (FAO, 2017). La producción se expresa en millones de toneladas (MMT) y el área cultivada en miles de hectáreas (Mha).

Posición	País	Producción (MMT)	Área cultivada (Mha)
1	China	59,63	1033,28
2	India	20,71	797,00
3	Turquía	12,75	187,07
4	EEUU	10,91	126,07
5	Egipto	7,3	182,44
6	Irán	6,18	153,73
7	Italia	6,01	99,75
8	España	5,16	60,85
9	México	4,24	93,00
10	Brasil	4,23	61,53
	Otros países	61,20	2056,66

Las regiones productoras de tomate en España se recogen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Regiones españolas productoras de tomate (FAO, 2017). La producción se expresa en miles de toneladas (MT) y el área cultivada en hectáreas (ha).

<b>Comunidad Autónoma</b>	<b>Producción (MT)</b>	<b>Superficie (ha)</b>
Andalucía	2229,97	24834
Extremadura	2075,70	24090
R. de Murcia	228,75	2476
Navarra	146,82	2059
Galicia	95,56	1143
Castilla La Mancha	82,93	1136
C. Valenciana	75,68	1259
Canarias	74,10	889
Aragón	56,67	704
Cataluña	46,47	1041
La Rioja	18,80	237
Baleares	10,71	367
País Vasco	6,87	289
Madrid	5,05	54
Castilla y León	4,97	115
P. de Asturias	3,54	142
Cantabria	0,80	17

En esta Tesis, se ha empleado la especie *S. lycopersicum* L. cv. Microtom (Figura 12). Se trata de una variedad de pequeño tamaño con frutos pequeños y poco carnosos. Además, la transformación genética de esta variedad es relativamente sencilla, lo que favorece su empleo como especie modelo. El fenotipo característico de este cultivar viene determinado por mutaciones en el metabolismo de los brasinoesteroides y el crecimiento vegetativo (Meissner et al., 1997).



Figura 12. Planta de *Solanum lycopersicum* L. var. Micro-Tom.

Las razones para el empleo de la planta de tomate en estudios genéticos y moleculares de forma paralela con otras especies vegetales modelo, como pueda ser *Arabidopsis*, son varias: por un lado, se ha observado cómo determinados genes no cumplen exactamente la misma función en una especie y en otra, por lo que es conveniente validar y ampliar los estudios ya realizados en *Arabidopsis* en otras especies vegetales. Un ejemplo de ello es que mientras que *AtHAK5* está implicado en la absorción de  $K^+$  de alta afinidad, *OsHAK1* tiene un papel relevante en la translocación de  $K^+$  en el tallo (Nieves-Cordones et al., 2016). Por otro lado, la investigación actual, requiere la transferencia de los hallazgos realizados en plantas modelo a la agricultura, por lo que el empleo de especies como el microtomate, son un paso intermedio entre ambas, puesto que la producción de frutos de este cultivar puede ser extrapolable a una planta de tomate comercial.



## **II - OBJETIVOS**





## II - OBJETIVOS

El  $K^+$  es uno de los elementos minerales más importantes en las plantas, representando aproximadamente el 10% del peso seco de la misma. Por este motivo, la nutrición de  $K^+$  se considera un factor clave para el adecuado desarrollo de cualquier planta o cultivo.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha consistido en la profundización del conocimiento de los sistemas implicados en la absorción de  $K^+$  en las plantas, llevando a cabo estudios de los procesos fisiológicos y los mecanismos moleculares implicados en la adquisición de este elemento. Estos se han realizado tanto en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, como en la especie con interés agronómico *Solanum lycopersicum*.

Los objetivos específicos que se han planteado en esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Estudio de la función de las proteínas quinasas AtCIPK1 y AtCIPK9 en la activación del transportador de  $K^+$  de alta afinidad AtHAK5 de *Arabidopsis*.
2. Caracterización del transportador SlHAK5 de tomate en plantas mutantes de pérdida de función generadas mediante CRISPR-Cas.
  - 2.1. Papel de SlHAK5 en la absorción de  $K^+$  y  $Cs^+$  de alta afinidad.
  - 2.2. Importancia de SlHAK5 en el crecimiento de plantas de tomate en presencia de salinidad.
  - 2.3. Función de SlHAK5 en la fertilidad de plantas de tomate.
3. Identificación de un sistema de absorción de  $K^+$  distinto de AtHAK5 y AKT1 mediante la generación de mutantes con EMS.



# **III - MATERIAL Y MÉTODOS**



### III - MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. Material biológico

###### 3.1.1.1. Bacterias y levaduras

La cepa de *Escherichia coli* TOP10 se empleó para la amplificación de plásmidos, y la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* 9.3, deficiente en los transportadores endógenos de entrada de K<sup>+</sup> TRK1 y TRK2 y las bombas de salida de Na<sup>+</sup> ENA1-ENA4, se empleó para la caracterización de sistemas implicados en la absorción de K<sup>+</sup>. Las características de cada una de estas cepas se detallan a continuación (Tabla 3):

Tabla 3. Cepas utilizadas.

Cepa	Genotipo	Referencia
Top 10	$\Delta(\text{araA-leu})7697$ , [araD139]B/r, $\Delta(\text{codB-lacI})3$ , $\phi 80\text{dlacZ58(M15)}$ , galK0, mcrA0, galU-, recA1, endA1, nupG-, rpsL-(strR), $\Delta(\text{mcrC-mrr})715$	(Edwards et al., 2011)
9.3	$\text{MAT}\alpha$ , $\text{ena1D}::\text{HIS3}::\text{ena4D}$ , $\text{leu2,ura3-1, trp1-1, ade2-1, trk1D, trk2}::\text{pCK64}$	(Bañuelos et al., 1995)

###### 3.1.1.2. Material vegetal

El trabajo experimental se ha llevado a cabo con plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Tabla 4) y *Solanum lycopersicum* L. variedad Microtom (Tabla 5).

Tabla 4. Líneas de Arabidopsis utilizadas.

Línea	Origen
Silvestre Col-0	<i>Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)</i>
<i>hak5-3</i>	(Rubio et al., 2008)
<i>akt1-2</i>	(Rubio et al., 2008)
<i>hak5-3 akt1-2</i>	(Rubio et al., 2010)
<i>cipk1</i>	(D'Angelo et al., 2006)
<i>cipk9</i>	(Liu et al., 2013)
<i>cipk23-5</i>	(Ragel et al., 2015)
<i>hak5-3 cipk1</i>	Esta Tesis
<i>hak5-3 cipk23-5</i>	(Ragel et al., 2015)
<i>akt1-2 cipk1</i>	Esta Tesis
<i>akt1-2 cipk23-5</i>	(Ragel et al., 2015)
<i>cipk1 cipk23-5</i>	Esta Tesis

Tabla 5. Líneas de tomate utilizadas.

Línea	Origen
Silvestre	Micro-Tom WT
<i>hak5-1</i>	Material del grupo de investigación
<i>hak5-2</i>	Material del grupo de investigación

### 3.1.2. Plásmidos

Los plásmidos empleados para la transformación de *S. cerevisiae* se especifican a continuación (Tabla 6):

Tabla 6. Plásmidos empleados para la transformación de *S. cerevisiae*.

Plásmido	Referencia
pGPD414	(Mumberg et al., 1995)
pYPGE15	(Brunelli and Pall, 1993)
pRS425	(Mumberg et al., 1995)
pDR195	(Rentsch et al., 1995)

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Sistemas de cultivo y condiciones de crecimiento de plantas

#### 3.2.1.1. Esterilización de semillas

La esterilización de las semillas de *Arabidopsis* se llevó a cabo en cabina de flujo laminar (TELSTAR Mini-H), empleando en primer lugar una mezcla de alcohol etílico al 70%, seguido de una mezcla de lejía comercial al 5 % y SDS (Dodecil Sulfato Sódico) al 0,5 % durante 15 minutos en agitación suave. Transcurrido este tiempo, se lavaron 5 veces con agua estéril, dejando el agua del quinto lavado. Posteriormente, las semillas se pasaron a oscuridad a 4 °C durante 24 horas.

Para la esterilización de semillas de tomate, se empleó, al igual que en el caso anterior, la cabina de flujo laminar. En primer lugar, las semillas se sumergían en una mezcla de alcohol etílico al 70% durante 1 minuto, para seguidamente emplear una mezcla de lejía comercial y agua destilada estéril en una proporción 3:1 durante 15 minutos en agitación suave. Transcurrido este tiempo, se lavaron 5 veces con agua estéril, dejando el agua del quinto lavado.

### 3.2.1.2. Cultivo de plantas en sistema hidropónico

El desarrollo de las plantas de *Arabidopsis* y la realización de los experimentos se llevaron a cabo en cultivo hidropónico (Gibeaut et al., 1997), empleando una cámara de cultivo con las condiciones de luz, humedad y temperatura controladas. El fotoperiodo fijado en la cámara de cultivo fue de 8 horas de luz, una temperatura de 22 °C y una humedad relativa del 65%. El sistema de iluminación empleado fue de tubos fluorescentes Philips (TLD 36/W 83, Silvana F 36WGRO), consiguiendo una densidad homogénea de flujo de fotones de 150  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  (Figura 13D).

Tras la esterilización de las semillas, la siembra de las mismas se realizó utilizando microtubos de 1,5 mL, a los cuales se les cortó la tapa y la parte inferior de los mismos y se rellenaron de lana de roca (Figura 13A). Este material inerte permitía un fácil desarrollo de la raíz a través del mismo y mantener la semilla en contacto con la solución nutritiva hasta que la planta desarrollara raíz suficiente. Tras rellenar los microtubos de lana de roca, se procedió a la esterilización de los mismos en autoclave. Estos tubos se insertaban en planchas de PVC (Policloruro de vinilo), a los que previamente se les había realizado perforaciones con el diámetro de los microtubos (Figura 13B). Dichas planchas, encajaban sobre cubetas de plástico de 2,5 L que contenían la solución nutritiva deseada. La solución nutritiva se renovaba de forma semanal desde la siembra hasta la finalización de los experimentos (Figura 13C).



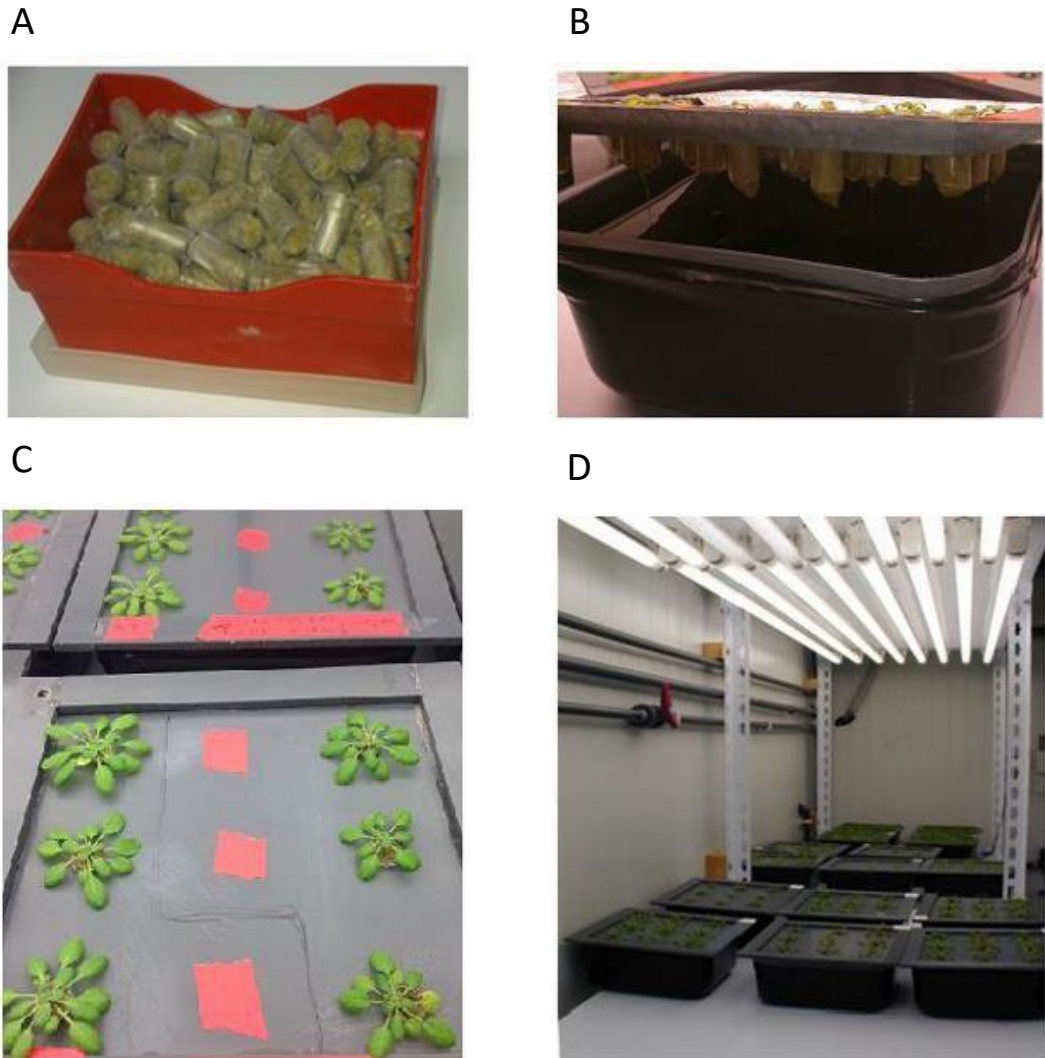


Figura 13. Sistema empleado para el cultivo hidropónico de *Arabidopsis* y cámara de cultivo con iluminación, temperatura y humedad controlada. A) Microtubos de 1,5 mL rellenos de lana de roca para la germinación de las semillas. B) Placa de PVC empleada como soporte de los microtubos con lana de roca, encajados sobre cubetas de 2,5 L con solución nutritiva. C) Crecimiento de plantas de *Arabidopsis* en sistema de cultivo hidropónico. D) Cámara de cultivo con condiciones controladas, en la que se puede observar el sistema de iluminación empleado.

Las plantas de tomate que se utilizaron para la realización de los distintos experimentos también se cultivaron en sistema hidropónico. En este caso, las semillas se pre-hidrataban en una placa Petri con un papel de filtro y agua estéril

durante 48 horas en oscuridad y a una temperatura de 28 °C. Transcurrido este tiempo, las semillas germinadas se pasaban a vermiculita hasta que empezaban a aparecer las hojas verdaderas. Durante el tiempo que las plántulas permanecían en la vermiculita, se regaban con agua destilada. Una vez las plántulas tenían hojas verdaderas, se pasaban al cultivo hidropónico en barreños de 4 L con la solución nutritiva adecuada para cada experimento. En experimentos de larga duración, los contenedores que se utilizaron fueron de 15 L. En todos los casos, la solución nutritiva se renovaba semanalmente, y los contenedores contaban con un sistema de aireación.

Los contenedores con las plantas de tomate se disponían en una cámara de cultivo, con un fotoperiodo de 16 horas de luz, una temperatura de 25 °C y humedad del 65% durante el día, y de 20 °C y 85%, respectivamente, durante la noche. El sistema de iluminación empleado consistió en bombillas led Philips) consiguiendo una densidad homogénea de flujo de fotones de 360  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ .

La solución nutritiva empleada tanto para las plantas de *Arabidopsis* como de tomate fue una modificación de la solución Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950), cuya composición se detalla en la Tabla 7. El pH de la solución se ajustó a 5,5 adicionando NaOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en función de lo que fuese necesario.

Tabla 7. Composición de la solución 1/5 Hoagland modificada con sus concentraciones finales.

Compuesto	Concentración final
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,4 mM
MgSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,35 mM
KCl	1,4 mM
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	1 mM
Fe-EDDHA	10 μM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12,5 μM
MnSO <sub>4</sub>	1 μM
ZnSO <sub>4</sub>	1 μM
CuSO <sub>4</sub>	0,5 μM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,1 μM
NiSO <sub>4</sub>	0,1 μM

#### 3.2.1.3. Cultivo en sustrato

El cultivo en sustrato tanto de *Arabidopsis* como de tomate, se llevó a cabo únicamente cuando la finalidad fue la obtención de semillas. En el caso de *Arabidopsis* se empleó una mezcla de turba negra, vermiculita y perlita en proporciones (3:2:1), esterilizada previamente en autoclave. Para tomate, el cultivo se llevó a cabo empleando únicamente la turba negra.

#### 3.2.1.4. Recolección de semillas

Una vez que las plantas de *Arabidopsis* empezaban a florecer, se colocaban los colectores comerciales Aracons™ (Arasystem-Betatech). Cuando la mayoría de las silicuas de la planta estaban maduras, se procedía a dejar secar la planta para llevar a cabo la recogida de las semillas mediante tamizado.

La recolección de las semillas de tomate consistió en la apertura de los frutos y la separación de las semillas del resto del fruto. Seguidamente, las semillas se incubaron con una solución de HCl al 5% durante media hora en agitación suave y transcurrido este tiempo se lavaron con agua destilada. Se

dejaron secar sobre papel de filtro a temperatura ambiente y una vez secas se almacenaron a 4 °C en oscuridad.

#### 3.2.1.5. Cultivo de *Arabidopsis* en medio sólido placa.

El cultivo de *Arabidopsis* en medio sólido en placa se empleó para la selección de plantas mutantes tolerantes a Cs<sup>+</sup>. Para ello, se utilizó solución 1/5H sin K<sup>+</sup>, a la que posteriormente se le añadió el KCl y CsCl necesarios para lograr las condiciones de selección. Para solidificar el medio, se adicionó agarosa a un porcentaje de 0,8% (p/v) y se procedió a la esterilización del medio mediante autoclave.

Previamente a la siembra de las semillas en la placa, éstas se esterilizaron siguiendo el procedimiento especificado en el apartado 0.

### 3.2.2. Cruzamiento de líneas de *Arabidopsis*

Para llevar a cabo el cruzamiento de las líneas de *A. thaliana*, se siguió el siguiente protocolo: En primer lugar, se llevó a cabo la selección de los botones florales que se encontraban en estado óptimo para ser fecundados y se procedió a su emasculación. Para ello se eliminaron las flores maduras que pudieran estar ya autofecundadas y todos los botones, a excepción de aquellos en los que los pétalos no eran todavía visibles. A éstos últimos, se les extirparon los sépalos, pétalos y los estambres todavía inmaduros, quedando únicamente el pistilo todavía no fecundado. Estas flores serían las receptoras del polen, y por lo tanto el parental femenino. Todo este proceso se llevó a cabo empleando pinzas de microcirugía Aesculap BD331, las cuales se esterilizaban mediante inmersión en alcohol etílico al 95% y secadas al aire.

A la planta utilizada como donante de polen, parental masculino, se le extirpó una flor madura, la cual presentaba los pétalos abiertos y se podían observar los granos de polen en sus anteras.

Con las pinzas, se pusieron en contacto las anteras del parental masculino con cada uno de los pistilos de las flores del parental femenino anteriormente diseccionadas. Tras la realización del cruce, se marcaron dichos cruzamientos colocando un hilo en el tallo de la flor, indicando el parental masculino empleado.

Las plantas en las que se realizaron los cruzamientos se mantuvieron en la cámara de cultivo hasta la formación de la silicua, recogiendo, una vez secas, de manera individual en microtubos de 1,5 mL junto con la información de los genotipos empleados en el cruzamiento.

Las semillas obtenidas de los cruzamientos se germinaron y se comprobó su genotipo mediante PCR sobre el ADN genómico extraído de cada planta. El objetivo era identificar una planta homocigota doble mutante para los genes de interés que estaban interrumpidos por inserciones de ADN de transferente. Se realizó la amplificación del fragmento de ADN adyacente a la inserción del ADN transferente, empleando las siguientes parejas de cebadores (Tabla 8):

Tabla 8. Cebadores empleados para la comprobación de las líneas mutantes de Arabidopsis obtenidas mediante cruzamiento.

Cebador	Secuencia
AtHAK5-F	CAATTGCACATGCTAAAAGACAGT
AtHAK5-R	CACCAGTGATGCAGAGGAAAAC
AKT1-F	CATTTATGAGGATCGGAAACAAG
AKT1-R	GGCTTTCTCAAGAACCCAAAC
AtCIPK1-F	TGTCGTGTCTTGGACA ACTAAGTG
AtCIPK1-R	TTAATACCCACA ACTGTG
AtCIPK23-F	GTTATGGAACATATTTGTGGTCC
AtCIPK23-R	AGCCTTCAGATCTACTCAATCC
AtCIPK9-F	TTCAAACCGAGTTTGAGGATG
AtCIPK9-R	TCCAAATTCTCCATCTGGTTG
LBb1.3-F	ATTTTGCCGATTCGGAAC

### 3.2.3. Métodos de caracterización fisiológica de plantas

#### 3.2.3.1. Medida del contenido mineral de los órganos vegetales

El análisis mineral de los órganos de las plantas estudiadas se llevó a cabo realizando en primer lugar la digestión ácida en solución  $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$  (2:1). Se pesaron 100 mg de material vegetal seco, previamente secado en estufa a 60 °C durante al menos 48 horas, y se añadieron 2 mL de la solución nítrico-perclórica a los tubos de vidrio con el material vegetal. Una vez colocados en el digestor se llevó a cabo la siguiente rampa de temperaturas: 90 °C durante 1 hora, 120 °C durante 4 horas, 180 °C durante 2 horas y finalmente 210 °C hasta que la muestra estuviera completamente digerida y el volumen de líquido fuese aproximadamente de 0,5 mL. Los tubos permanecieron tapados con canicas de vidrio para evitar la evaporación del ácido, siendo retiradas en el último paso, a 210 °C para lograr la evaporación del mismo. Una vez enfriadas las muestras se añadió agua milli-Q hasta 10 mL.

La concentración de los iones en las muestras se determinó mediante espectrometría ICP (Iris Interprid II, Thermo Electron Corporation). Los datos se expresaron en milimoles por gramo de peso seco de material vegetal ( $\text{mmol g}^{-1}$ ).

Para la determinación de la concentración de  $\text{Cs}^+$  de las plantas estudiadas, las muestras se trataron como se ha indicado anteriormente, pero se determinó el  $\text{Cs}^+$  utilizando espectrometría de emisión atómica, usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo ICP 500.

#### 3.2.3.2. Cálculo de las tasas de absorción y translocación desde la raíz a la parte aérea de $\text{Rb}^+$ y $\text{Cs}^+$

Una vez conocidas las concentraciones de los iones presentes en los diferentes órganos vegetales se procedió al cálculo de la tasa de absorción de  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Cs}^+$  de las plantas sometidas a los experimentos de absorción de estos cationes, calculándose dicha tasa como el total de  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Cs}^+$  en la planta por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo (hora).

La tasa de translocación de  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Cs}^+$  desde la raíz a la parte aérea se calculó como el total de  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Cs}^+$  presente en la parte aérea por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. En relación con esta tasa de translocación, se calculó el

porcentaje de  $Rb^+$  translocado, expresado como el porcentaje de  $Rb^+$  presente en la parte aérea respecto al total que contiene la planta.

### 3.2.3.3. Medida del potencial eléctrico de membrana

La determinación del potencial eléctrico de membrana de las células epidérmicas o corticales de la raíz de plantas de tomate se llevó a cabo mediante el empleo de microelectrodos de borosilicato (Maathuis and Sanders, 1994). Las raíces se fijaron en una cámara de perfusión de aluminio acoplada a un portaobjetos de microscopía. En dicha cámara, las raíces permanecían bañadas en solución control (10 mM de MES-Ca pH 6,1) con una velocidad de perfusión de  $10 \text{ mL min}^{-1}$ . Mediante el empleo de un micromanipulador, se llevaba a cabo la introducción de los microelectrodos simples de borosilicato (1B120F-4, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL) en las primeras capas de células de la raíz hasta obtener un potencial eléctrico de membrana estable con respecto al electrodo de referencia que estaba en contacto con la solución externa a la raíz. Cada capilar se introducía en un portaelectrodos (MEHF1S10, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL) que contenía una semicélula  $Ag/AgCl$ , y éste y el electrodo de referencia se conectaban a un amplificador de alta impedancia (DUO 773, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL).

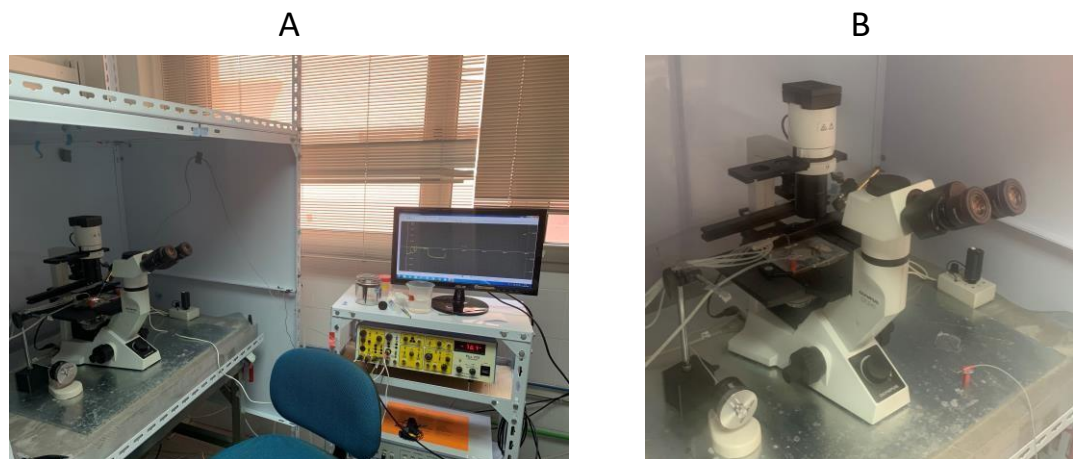


Figura 14. Equipo para llevar a cabo los registros de potencial eléctrico de membrana en células de raíz de tomate. A) Cabina de Faraday con microscopio y micromanipulador, y amplificador en el exterior. B) Imagen del microscopio en el que se observan los microelectrodos y la semicélula de  $Ag/AgCl$ .

### 3.2.3. Métodos de transformación

#### 3.2.3.1. Transformación de bacterias

##### 3.2.3.1.1. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

Para la preparación de células competentes de *E. coli* para su transformación por electroporación, se siguió el protocolo siguiente:

Se inoculó una colonia aislada, procedente de una placa de medio LB en la que previamente se había inoculado la bacteria y crecido durante 24 horas a 37 °C, en 3 mL de LB líquido y se incubó durante toda la noche a 37 °C en agitación. Al día siguiente, se inocularon 20 mL de medio LB con 100 µL de ese cultivo y se dejó crecer el cultivo durante toda la noche en agitación. Pasado este tiempo, 12 mL de este cultivo se añadieron a 1,2 L de LB previamente precalentado a 37 °C durante la noche anterior en el incubador. A continuación, se creció el cultivo en agitación durante aproximadamente 5 horas hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,6-0,7. El cultivo se centrifugó a 4000  $\times$  g durante 15 minutos, habiendo enfriado previamente la centrífuga a 4 °C, con el fin de detener el crecimiento del cultivo lo más rápido posible. Tras este primer paso por la centrífuga, se descartó el sobrenadante y se lavaron las células resuspendiéndolas en agua estéril fría, utilizando el mismo volumen inicial (1,2 L). Se volvieron a centrifugar las células y tras descartar el sobrenadante, esta vez se resuspendieron en la mitad del volumen inicial y se volvieron a centrifugar. Tras la última centrifugación, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 mL de glicerina estéril al 10 % fría. Por último, esta suspensión de células se dispuso en alícuotas de 40 µL que se congelaron rápidamente sumergiendo los microtubos en nitrógeno líquido, para finalmente ser almacenadas a -80 °C.

Tras este proceso se llevó a cabo la comprobación de la eficiencia de transformación de las células empleando ADN de un plásmido utilizado como control.

##### 3.2.3.1.2. Transformación de *E. coli* mediante electroporación

Se mezcló el ADN con el que se deseaba transformar las células junto con las células competentes en una cubeta de electroporación de 0,2 cm y se le aplicó



un pulso de 3 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  y aproximadamente 5 milisegundos de duración en un electroporador GenePulser® MicroPulser™ (BioRad, Hercules CA, EEUU). Rápidamente, se añadió 1 mL de LB líquido estéril y la mezcla se incubó a 37 °C en agitación suave durante 1 hora. Transcurrido el tiempo indicado, las células se recogieron tras ser centrifugadas a 7.828  $\times$  g durante 5 minutos y se extendieron en LB sólido con el antibiótico de selección correspondiente.

### 3.2.3.2. Transformación de *S. cerevisiae*

Para la transformación de las cepas de *S. cerevisiae* se empleó el método del “acetato de litio” (Elble, 1992).

En primer lugar, se inoculó una colonia de la cepa de interés en 10 mL de medio YPD líquido con 100 mM de K<sup>+</sup> para evitar la reversión de la cepa 9.3, y se creció durante toda la noche a 28 °C en agitación suave. Una vez llegado el cultivo a una DO<sub>600</sub> de 1,5-2, las células se recogieron mediante centrifugación y se añadieron entre 1 y 2  $\mu$ g de ADN y 500  $\mu$ L de solución PLATE (Tabla 9), mezclando suavemente con la ayuda de la pipeta.

Tabla 9. Composición de la solución PLATE para transformación de *S. cerevisiae*.

PEG (MW 3350)	40 % (v/v)
Acetato de litio	100 mM
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

Las células junto con el tampón se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente, se recogieron mediante centrifugación a 6.262  $\times$  g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las células resuspendiéndolas en agua estéril dos veces, centrifugándose entre cada paso. Las células recogidas tras el segundo lavado, se extendieron en medio selectivo y se incubaron durante aproximadamente 48 horas a 28 °C, hasta que aparecieron las primeras colonias.

### 3.2.4. Medios y condiciones de cultivo de bacterias y levaduras

Para el cultivo de las cepas de *E. coli* se utilizó el medio Luria-Broth (LB) cuya composición se detalla en la Tabla 10. Para el crecimiento y la selección de las células transformadas se emplearon los siguientes antibióticos de selección a las concentraciones que se indican: ampicilina (100 mg/L).

El cultivo de *E. coli* se realizó a una temperatura constante de 37 °C y en el caso de cultivos líquidos se realizaba a la misma temperatura y en agitación. Para *A. tumefaciens*, la temperatura de crecimiento fue de 28 °C, y al igual que en el caso anterior, se empleaba un agitador cuando se trataba de medios líquidos.

Tabla 10. Composición medio LB.

Triptona	1% (p/v)
Extracto de levadura	0,5% (p/v)
Cloruro sódico (NaCl)	0,5% (p/v)
Agar bacteriológico *	1,5% (p/v)

\* Se adicionó para la preparación de medio sólido.

El crecimiento y propagación de *S. cerevisiae* se realizó en medio YPD (Yeast Peptone Dextrose) (Tabla 11) (Frederick M. Ausubel, 1989).

Tabla 11. Composición del medio YPD.

Extracto de levadura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Glucosa	2% (p/v)
Agar bacteriológico *	1,5% (p/v)

\* Se adicionó para la preparación de medio sólido.

Como medio selectivo para levadura se utilizó el medio SD (Sherman Dextrose) (Tabla 12) (Sherman, 1991) suplementado con los requerimientos necesarios (adenina (20 mg/L), uracilo (20 mg/L), leucina (40 mg/L), triptófano (30

mg/L) e histidina (20 mg/L), excluyendo la adición de los requerimientos apropiados para la selección de los transformantes en cada caso.

Tabla 12. Composición SD.

YNB	1% (p/v)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2% (p/v)
Glucosa	2% (p/v)
Agar bacteriológico*	1,5% (p/v)

\* Se adicionó para la preparación de medio sólido.

Los experimentos de complementación en levadura utilizando diferentes concentraciones de K<sup>+</sup> en el medio se llevaron a cabo en el medio mínimo Fosfato de Arginina (PA) (Rodríguez-Navarro and Ramos, 1984). La composición del mismo se detalla en las Tablas 13, 14 y 15.

Tabla 13. Composición medio PA.

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8 mM
L-Arginina	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM
KCl	Variable según ensayo
Glucosa	20 % (p/v)
Oligoelementos (1000X)*	1 X
Vitaminas (100X)**	1 X
Agar Bacteriológico	1,5 % (p/v)

\* Oligoelementos (Stock 1000X) (Tabla 14)

\*\* Vitaminas (Stock 100X) (Tabla 15). La esterilización de las vitaminas se realizó mediante filtración.

Tabla 14. Composición oligoelementos 1000X.

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	500 mg/mL
CuSO <sub>4</sub>	40 mg/mL
KI	100 mg/mL
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	400 mg/mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	200 mg/mL
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400 mg/mL
FeSO <sub>4</sub>	500 mg/mL

Tabla 15. Composición mezcla vitaminas 100X.

Tiamina (Vit.B1)	40 mg/L
Ácido nicotínico (Vit.B3)	40 mg/L
Ácido pantoténico (Vit.B5)	40 mg/L
Piridoxina (Vit.B6)	40 mg/L
Biotina (Vit.B7)	20 mg/L

Los distintos medios de cultivo que se emplearon para el crecimiento de bacterias y levaduras se esterilizaron en autoclave, empleando condiciones de sobrepresión de 1 atmósfera y 120 °C durante 20 minutos.

### **3.2.5. Complementación funcional por crecimiento a bajo K<sup>+</sup> de *S. cerevisiae* en medio sólido**

Para estudiar la complementación funcional del transporte de K<sup>+</sup> de los distintos transformantes de *S. cerevisiae* obtenidos, se emplearon placas de PA con diferentes concentraciones de KCl, con el objetivo de poder estudiar el crecimiento de la levadura dada su capacidad de formación de colonias.

El cultivo de las células de levadura se realizaba previamente en medio YPD con una concentración suficiente de K<sup>+</sup> (100 mM). Este cultivo previo se llevaba a cabo con una cantidad alta de K<sup>+</sup> en el medio que aseguraba la entrada del mismo en las células de levadura a través de sistemas no selectivos, e impedía la reversión de la cepa de levadura. Tras ser incubado durante toda la noche en agitación a 28 °C, se determinó la densidad óptica del cultivo (DO<sub>600</sub>) y se realizaron las diluciones decimales seriadas en agua estéril para conseguir suspensiones con densidades ópticas (DO<sub>600</sub>) de: 1, 0,1, 0,01 y 0,001. Seguidamente, se inocularon 10 µl de cada suspensión en placas de cultivo cuadradas con medio PA sólido con distintas concentraciones de K<sup>+</sup>. El tiempo de incubación a 28 °C hasta observar la formación de colonias fue variable y dependiente del K<sup>+</sup> y del fenotipo de complementación, oscilando entre 3 y 5 días.

### **3.2.6. Manipulación de ácidos nucleicos**

#### *3.2.6.1. Extracción y análisis de ADN*

Todo el material utilizado para las técnicas de extracción y posterior manipulación del ADN se esterilizó mediante autoclave a 120 °C durante 20 min y 1 atmósfera de sobrepresión antes de ser utilizado. Las soluciones termolábiles se esterilizaron por filtración empleando filtros de 0,22 µm.

3.2.6.1.1. Purificación de ADN plasmídico de *E. coli*

La extracción del ADN plasmídico amplificado en *E. coli* se llevó a cabo empleando el método de lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001).

## 3.2.6.1.2. Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala

Previamente a la realización del protocolo de lisis celular y extracción del ADN plasmídico, se creció una colonia de las células de *E. coli* transformadas con el plásmido de interés, en 3 ml de LB líquido con el antibiótico de selección correspondiente durante la noche anterior a 37 °C en agitación suave. Una vez el cultivo estaba bien crecido, las células se recogieron por centrifugación y se añadió un volumen de la solución I (Tabla 16). Tras resuspender las células en dicha solución, se añadieron dos volúmenes de la solución II (

Tabla 17) preparada al momento, y se mezcló cuidadosamente invirtiendo el microtubo en repetidas ocasiones. A continuación, se añadieron 1,5 volúmenes de acetato potásico 3M pH 6 y se volvió a mezclar todo por inversión. Se incubó en hielo durante 10 min.

Tabla 16. Composición de la solución I.

Tris/ HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	25 mM
Glucosa	10 %(p/v)

Tabla 17. Composición de la solución II.

NaOH	200 mM
SDS	1%

Transcurrido el tiempo de incubación en hielo, se separó mediante centrifugación el ADN plasmídico en solución de los restos celulares, adicionándole al sobrenadante 2,5 volúmenes de alcohol isopropílico para precipitar el ADN. La mezcla se incubó en hielo durante aproximadamente 20 minutos y se recogió el precipitado de ADN mediante centrifugación.

Seguidamente, se añadió alcohol etílico al 70% para lavar y eliminar restos. Tras volverlo a centrifugar y descartar el sobrenadante, se dejó secar el precipitado de ADN, tras lo cual se resuspendió en un volumen adecuado de agua estéril con ARNasa (Roche®) a una concentración de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Cuando era necesario un mayor grado de pureza del ADN plasmídico, se empleó el kit comercial de purificación de ácidos nucleicos FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 3.2.6.1.3. Purificación de ADN plasmídico a gran escala

Previamente a la realización del protocolo de lisis celular y extracción del ADN plasmídico, se creció una colonia de las células de *E. coli* transformadas con el plásmido de interés, en 100 ml de LB líquido con el antibiótico de selección correspondiente durante la noche anterior a 37 °C en agitación suave. El cultivo bien crecido se centrifugó durante 15 min a 7.828  $\times g$  y las células se resuspendieron en 5 mL de GTE (Tabla 18). Se incubó la mezcla en hielo durante 15 min y se añadieron 10 mL de la solución II(Tabla 17), mezclándolo suavemente por inversión y volviéndolo a incubar 15 minutos en hielo. Seguidamente, se añadieron 7,5 mL de acetato potásico 3 M pH 4,8, mezclándolo nuevamente por inversión y se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 21.920  $\times g$  durante 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante se recogió utilizando una gasa filtradora estéril.

Tabla 18. Composición tampón GTE.

Tris/ HCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Glucosa	1 %(p/v)

Seguidamente, se añadió a la solución recogida 1 volumen de alcohol isopropílico y se incubó en hielo durante 20 minutos para conseguir la precipitación de los ácidos nucleicos. Se centrifugó a 21.920  $\times g$  durante 15 minutos a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 2,5 mL de TE (Tabla 19) y se añadieron 2,5 mL de LiCl 6 M, incubando en hielo 15 minutos. A continuación, se

centrifugó a  $21.920 \times g$  10 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo de vidrio COREX®, al que se añadió 1 volumen de alcohol isopropílico y se dejó incubando en hielo durante 20 minutos más. Transcurrido este tiempo, se centrifugó de nuevo empleando las mismas condiciones que las anteriores.

Tabla 19. Composición tampón TE.

Tris/ HCl pH 7,5	25 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Tras la centrifugación en los tubos COREX®, el precipitado se resuspendió en 0,5 mL de TE y se pasó a un microtubo de 1,5 mL, al que se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M y 0,5 mL de alcohol isopropílico. La mezcla se incubó en hielo 20 minutos y se centrifugó a  $21.920 \times g$  10 minutos. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se adicionó al precipitado 1 volumen de alcohol etílico al 70%, volviéndose a centrifugar a continuación en las mismas condiciones que en el paso anterior. Una vez seco el precipitado de ADN, se resuspendió en un volumen adecuado de agua estéril con ARNasa (Roche®) a una concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 3.2.6.1.4. Extracción de ADN genómico de *A. thaliana*

La extracción de ADN genómico de *A. thaliana* se llevó a cabo empleando el siguiente procedimiento (Edwards et al., 1991):

Se tomaron aproximadamente 100 mg de material vegetal fresco, hoja o raíz, y se introdujeron en un microtubo de 1,5 ml que se congeló inmediatamente introduciendo nitrógeno líquido en su interior. Seguidamente, la muestra se molió empleando micro morteros de plástico estériles adecuados para el microtubo.

A continuación, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción CTAB previamente calentado a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tabla 20) y arena de mar estéril, homogeneizando la muestra nuevamente empleando el agitador vórtex para tubos de ensayo. Se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se agitó en el vórtex durante 1 minuto, para seguidamente incubar la muestra a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$



durante 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo de incubación, se centrifugó a  $21.920 \times g$  durante 1 minuto para separar los restos celulares del material genético presentes en el sobrenadante. Se pasó cuidadosamente el sobrenadante a un microtubo nuevo de 1,5 mL y se añadió 1 volumen de alcohol isopropílico, dejándolo incubar en hielo durante 15 min, para seguidamente centrifugarlo a  $21.920 \times g$  durante 15 minutos. El precipitado se lavó con alcohol etílico al 70%, y tras dejarlo secar, se resuspendió en aproximadamente 50  $\mu$ L de agua estéril, variando este volumen en función del tamaño del precipitado obtenido.

Tabla 20. Composición del tampón de extracción CTAB.

Tris/ HCl pH 8,0	220 mM
EDTA-Na <sub>2</sub> pH 8,0	22 mM
NaCl	800 mM
d-Sorbitol	140 mM
n-laurilsarcosina	1% (p/v)
CTAB	0,8 % (p/v)

#### 3.2.6.1.5. Cuantificación de ADN

La cuantificación de la concentración de ADN se llevó a cabo empleando un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

#### 3.2.6.1.6. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés “Polymerase Chain Reaction”) es un método enzimático en el que se produce la replicación *in vitro* de secuencias específicas de ADN empleando cebadores específicos para la región de ADN que se desea amplificar.

Para esta técnica, se empleó la enzima *Taq* polimerasa procedente del kit comercial IBIAN®-Taq DNA polimerasa (IBIAN Technologies) junto con el resto de los componentes necesarios para la reacción de amplificación, especificados en la Tabla 21.

Tabla 21. Reactivos utilizados para la amplificación por PCR de fragmentos de interés.

ADN	10-500 ng
Tampón Taq (10 X)	1 X
dNTPs-Mix (40 mM)	800 $\mu$ M
Cebadores	1,25 – 5 $\mu$ M
Polimerasa <i>Taq</i>	0,25 – 5 U
Agua Sigma®	Hasta 50 $\mu$ L
Volumen final	50 $\mu$ L

Los ciclos de amplificación (Tabla 22) consistieron en un primer paso de desnaturalización, seguido del alineamiento de los cebadores a la región específica del ADN y, por último, la amplificación de dicha región llevada a cabo por la Taq polimerasa. Las temperaturas y tiempos de cada una de estas etapas se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22. Condiciones del termociclador para la amplificación de fragmentos de interés.

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	5'
Desnaturalización	95 °C	30''
Alineamiento	45 – 65 °C *	1'
Extensión	72 °C	**
Extensión final	72 °C	5'

x 25-35

\* Temperatura variable en función de la temperatura de alineamiento de los cebadores.

\*\* Tiempo variable en función del tamaño de producto de PCR, 1' por Kb de ADN a amplificar.

#### 3.2.6.1.7. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Los geles de agarosa se preparaban con porcentajes variables de agarosa que oscilaron entre 0,8-1,5 % (p/v) según las necesidades de cada experimento. La agarosa se fundía en tampón TAE 1X (40 mM Tris/ Acetato, 1 mM EDTA), añadiendo 0,05  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de RedSafe™ (INtRON Biotechnology), para visualizar el ADN a la luz UV.

Para cargar las muestras en el gel, se adicionó a cada una de ellas tampón de carga de ADN 5X (60% glicerina, 0,25 azul de bromofenol, 20 mM EDTA pH 8 y 1 mg/mL ARNasa) y a continuación se cargaron en los pocillos del gel. La electroforesis se llevó a cabo empleando en la cubeta el mismo tampón que se utilizó para el gel de agarosa y el voltaje aplicado osciló entre 80-120 V.

Las fotografías del gel se realizaron empleando el sistema Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare).

#### 3.2.6.2. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real

##### 3.2.6.2.1. Extracción y cuantificación de ARN

La extracción de ARN de plantas para llevar a cabo la cuantificación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real, se llevó a cabo empleando el kit comercial de extracción de ARN NucleoSpin®, RNA Plant (Macherey-Nagel).

Para la molienda y homogeneización del material vegetal se empleó mortero y maza cerámicos esterilizados en autoclave y nitrógeno líquido. Tras este primer paso, se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante.

Una vez realizada la extracción del ARN, se trataron las muestras con ADNasa para asegurar la eliminación de ADN en las mismas. Para este proceso, se empleó el kit comercial DNA-free™ (Applied Biosystems/Ambion), siguiendo las instrucciones indicadas.

La concentración y la calidad de las muestras de ARN se determinaron con el sistema Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

## 3.2.6.2.2. Síntesis de ADNc

Para la síntesis del ADN de cadena simple se utilizó el kit comercial 'High capacity cDNA Reverse transcriptions Kit (Applied Biosystems). El protocolo de temperaturas empleadas que se seleccionaron en el termociclador se indican en la tabla Tabla 23.

Tabla 23. Condiciones para la síntesis de ADN complementario.

	Temperatura	Tiempo
Paso 1	25 °C	10'
Paso 2	37 °C	120'
Paso 3	85 °C	5'
Paso 4	4 °C	∞

## 3.2.6.2.3. Cuantificación relativa de la expresión génica

La PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR, del inglés "*Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction*") consiste en la detección y cuantificación de los niveles de ARNm del gen de interés que presentan las muestras, de manera que se puede realizar una estimación de los niveles de expresión de dichos genes. En esta técnica se emplea un fluoróforo que permite seguir la cantidad de ADN amplificado en cada ciclo de la reacción.

Este tipo de PCR se realiza sobre muestras de ADNc, con cebadores que amplifican secuencias concretas del gen de interés. Cuanto más alto sea el nivel de transcripción del gen, mayor será la cantidad de su ARNm en el tejido analizado.

Esta técnica se llevó a cabo mediante el empleo del equipo "7500 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems), y el agente intercalante SYBR® Green como agente fluoróforo.

Las reacciones se prepararon con el kit comercial KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2x) Universal (KAPABIOSYSTEMS). Los componentes necesarios para esta técnica se detallan en la Tabla 24.

Tabla 24. Componentes de la reacción de RT-qPCR.

ADNc (1 µg/µL)	2 µL
SYBR Green Mix® *	10 µL
ROX Low (10 nM)	0,4 µL
Cebador 5' (0,2 µM)	0,4 µL
Cebador 3' (0,2 µM)	0,4 µL
Agua Sigma®	6,8 µL
Volumen final	20 µL

Las reacciones se llevaban a cabo en placas de 96 pocillos, PCR® Microplate (Axygen INC.), selladas con un film óptico autoadhesivo, Platemax® UltraClear Sealing Film (Axygen INC.), para evitar la evaporación durante la reacción.

Los ciclos de la reacción de amplificación se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Condiciones para amplificación por RT-qPCR.

	Temperatura	Tiempo
Activación enzimática	95 °C	3'
Desnaturalización	95 °C	30''*
Alineamiento/extensión	60°C	35''*

\* x 25-35 ciclos

#### 3.2.6.2.4. Análisis de la cuantificación relativa: método comparativo $C_T$ (ciclo umbral)

Para el análisis de los resultados obtenidos de los experimentos de RT-qPCR se empleó el método de cuantificación relativa, basado en la expresión del gen diana respecto a un gen de referencia utilizado como control, dado que los niveles de expresión de este gen constitutivo no cambian en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas.

Los niveles de expresión se determinaron empleando el método del  $C_T$  (*Threshold Cycle*) comparativo ( $\Delta\Delta C_T$ ), comparando el valor de  $C_T$  del gen de interés con el del gen de referencia. Este valor se define como el ciclo de la PCR en el cual la señal de fluorescencia se cruza con la línea umbral, lo cual indica la primera detección del producto de PCR. Este punto de la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo una relación lineal entre el logaritmo del cambio de fluorescencia y el número de ciclos.

El valor del *"Fold Change"* (FC) muestra la variación de expresión del gen diana en las condiciones de estudio frente a las condiciones control, tomando las muestras control como muestras calibradoras del experimento. Los cálculos para llevar a cabo este análisis son los siguientes:

A partir de los valores de  $C_T$  se calcula el  $\Delta C_T$ :

$$\Delta C_T = C_T (\text{gen diana}) - C_T (\text{gen de referencia})$$

A continuación, se calcula el  $\Delta\Delta C_T$ :

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{muestra estudio}) - \Delta C_T (\text{muestra calibradora})$$

Por último, se calcula el valor del FC aplicando la siguiente expresión:

$$FC = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$$

Valores de FC próximos a 1 indican un nivel de expresión del gen diana similar en las condiciones de estudio y las condiciones control. Valores superiores a 1, indican una inducción del gen en las condiciones de estudio, mientras que valores inferiores a 1, indican la represión del gen en dichas condiciones. Los resultados se presentan con  $\text{Log}_2(\text{FC})$ .

### **3.2.7. Germinación del polen, elongación del tubo polínico y estimación del contenido interno de $K^+$ en plantas de tomate**

Previamente a la realización de experimentos de estudio del polen de tomate, se procedió la recolección masiva del mismo, con el objetivo de obtener gran cantidad de éste para la realización de experimentos y al mismo tiempo, homogeneizar la muestra, evitando así las posibles diferencias que pudieran existir entre distintas flores. Para ello, con la ayuda de un cepillo de dientes eléctrico, al que se le acopló una punta de micropipeta de 1 mL, se agitaron las flores de una en una vertiendo el polen en un microtubo de 1,5 mL. Es importante

destacar que las flores debían ser seleccionadas en el mismo estado de madurez. Una vez recogido el polen, se almacenó a 4 °C y en oscuridad.

Para los experimentos de germinación de polen se empleó el medio que se detalla en la (Tabla 26) (Maisonneuve and Den Nijs, 1984), que se esterilizó mediante autoclave tras su preparación.

Tabla 26. Composición del medio de germinación de polen.

Sacarosa	10 % (p/v)
Agar	0,5 %(p/v)
Ácido bórico	50 ppm

La concentración de K<sup>+</sup> basal de este medio fue aproximadamente de 100 μM.

Para los experimentos de germinación en los que se calculó el porcentaje de germinación y la longitud del tubo polínico, se vertieron 500 μL de medio sobre un portaobjetos de microscopía. Una vez solidificado el medio, se espolvoreó el polen sobre el mismo y se incubó en la cámara utilizada para el cultivo de tomate dentro de una placa Petri con papel de filtro humedecido con agua en la base para evitar que el medio perdiese humedad. El tiempo de incubación para estos experimentos fue de 4 horas. Los granos de polen germinados se observaron al microscopio Leica DM6 y se procedió a la captación de imágenes de los mismos. La determinación de la longitud del tubo polínico se realizó empleando el programa informático ImageJ.

Para estimar la concentración interna de K<sup>+</sup> del grano de polen se empleó el tinte Ion-K<sup>+</sup> green 4 AM (IPG-4, Iona Biosciences, San Marcos, TX USA), permeable a la membrana celular, añadiéndose al medio de germinación a una concentración de 20 μM. El polen se sembró por la tarde e incubó durante toda la noche en la cámara de cultivo de tomate, utilizando, igual que en el caso anterior, placas Petri con papel de filtro humedecido. Las muestras se observaron un microscopio de epifluorescencia Leica DM6, recuperando la señal de fluorescencia con un filtro de paso de 527/30 nm después de excitar a 480/40 nm. Se captaron las imágenes y la fluorescencia se determinó empleando el programa ImageJ,

después de restar de los datos obtenidos la fluorescencia media de los granos de polen germinados en ausencia de tinte.

### **3.2.8. Mutagénesis de semillas de Arabidopsis con Metilsulfonato de etilo (EMS)**

El EMS es un agente alquilante que induce modificaciones químicas de los nucleótidos, lo que provoca cambios en las pares de bases. Generalmente, induce cambios de Citosina (C) por Timina (T). Este tipo de mutagénesis con EMS provoca mutaciones distribuidas de forma aleatoria por todo el genoma (Kim et al., 2006).

La mutagénesis de las semillas de Arabidopsis se llevó a cabo utilizando el siguiente protocolo:

En primer lugar, se incubaron durante toda la noche las semillas de Arabidopsis en una solución de cloruro potásico al 0,1% (p/v) empleando un tubo de ensayo Falcon de 50 mL.

Al día siguiente, se retiró la solución y se añadieron 7 mL de una solución preparada al momento que contenía: fosfato sódico 0,1 M pH5, DMSO al 5% (v/v) y EMS 75 mM. Las semillas se incubaron durante 4 horas en esta solución y trascurrido este tiempo, se procedió a la retirada de la solución y su neutralización mediante la adición de tiosulfato sódico sólido.

Se realizaron dos lavados de 15 minutos cada uno con tiosulfato sódico 100 mM, descartando esta solución al recipiente con tiosulfato sódico sólido. A continuación, se realizaron otros dos lavados de 15 minutos con agua destilada, eliminando el agua también al recipiente mencionado anteriormente.

Tras los lavados, y haber retirado el agua completamente, se añadió agarosa al 0,15% (p/v) y se guardaron las semillas a 4 °C durante una noche.

Por último, se procedió a la siembra de las semillas (generación M1). Para ello se emplearon bandejas de plástico de 40 x 60 cm que se llenaron de una mezcla de turba negra, vermiculita y perlita con una proporción de 3:2:1 respectivamente (Figura 15).





Figura 15. Bandeja de PE de 40x60 cm con sustrato para el crecimiento de las semillas mutagenizadas. La composición del sustrato fue una mezcla de turba negra, vermiculita y perlita con una proporción de 3:2:1 respectivamente.

### 3.2.9. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistix V.8 para Windows (Analytical Software, Tallahassee, FL). Las diferencias en las medias se compararon mediante la prueba t de Student para comparaciones entre pares, o mediante la prueba de rango múltiple de Tukey ( $P < 0,05$ ) después de realizar un ANOVA. Para la representación de los datos se empleó el Sigma Plot 9.0.



## **IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS AtCIPK1 Y AtCIPK9 EN LA ACTIVACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE K<sup>+</sup> DE ALTA AFINIDAD AtHAK5

#### 4.1.1. Identificación de CIPKs capaces de activar AtHAK5 en levadura

Las proteínas quinasas de la familia CIPK son piezas fundamentales en la señalización mediada por Ca<sup>2+</sup>. Son muchos los estudios llevados a cabo en Arabidopsis que han demostrado la interacción de las proteínas CIPK con los sensores de calcio CBL cuando las plantas se encuentran sometidas a estreses, tanto bióticos como abióticos, y en particular a estrés debido a deficiencia de nutrientes (Pandey et al., 2014).

Como se ha mencionado, las quinasas de la familia CIPK son importantes reguladores de los sistemas de adquisición de nutrientes en las raíces de las plantas. En concreto, se ha descrito en Arabidopsis que el sistema de entrada de K<sup>+</sup> de alta afinidad AtHAK5, se activa mediante la fosforilación del mismo por la quinasa AtCIPK23, en cooperación con los sensores de Ca<sup>2+</sup> AtCBL1 y AtCBL9 (Ragel et al., 2015). En trabajos previos del grupo, publicados en la Tesis doctoral de Reyes Ródenas (2019) (Rodenas, 2019), se llevaron a cabo experimentos de complementación en levadura en condiciones limitantes de K<sup>+</sup> (0,01 μM K<sup>+</sup>) en los que se estudió el grado de activación del transportador AtHAK5 mediado por cada una de las 26 AtCIPK de Arabidopsis. El objetivo de este estudio fue encontrar alguna otra quinasa distinta de AtCIPK23 capaz de activar el transportador AtHAK5 en condiciones limitantes de K<sup>+</sup> y permitir el crecimiento de la levadura a bajo K<sup>+</sup>.

Como se mostraba en este trabajo, algunas de ellas, como AtCIPK2, 3, 6, 11, 15, 21, 24, 22 y 25 no mejoraron el crecimiento con respecto al control sin ninguna AtCIPK. Otras, como AtCIPK5, 8, 13, 16, 17, 18 y 19, produjeron una leve mejoría en el crecimiento, mientras que AtCIPK1, 4, 7, 9, 10, 12, 14, 20, 26 y 23, mejoraron significativamente el desarrollo de la levadura (Figura 16).

En esta Tesis Doctoral, se ha buscado relacionar el grado de activación del transportador AtHAK5 por las distintas AtCIPK con la filogenia de las mismas. Para ello, se elaboró un árbol filogenético de dicha familia de proteínas y se observó que no existía una correlación entre el grupo filogenético al que pertenecía cada AtCIPK y el grado de complementación funcional al que daba lugar en la levadura. Así, se podía observar que las proteínas que activaban en mayor medida el crecimiento de la levadura pertenecían a distintos grupos filogenéticos (Figura 16).

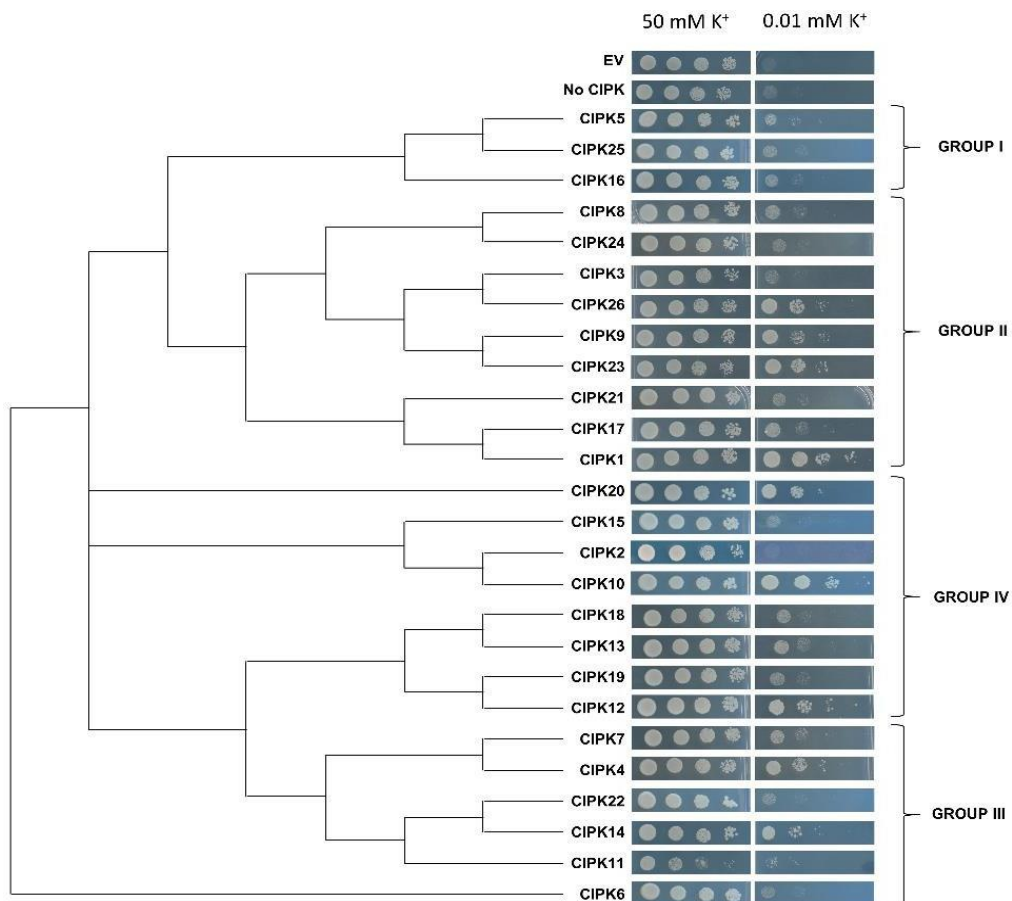


Figura 16. Árbol filogenético representativo de la familia AtCIPK junto con imágenes de ensayo de complementación de la levadura por AtHAK5 y las 26 CIPK de Arabidopsis publicadas en la Tesis doctoral de Reyes Ródenas (Ródenas, 2019). En las imágenes se representa la cepa de levadura 9.3 coexpresando el sensor de calcio AtCBL1, el transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad AtHAK5 y cada una de las AtCIPK que se indican.

De entre todas las quinasas, AtCIPK1 fue la que mejoró en mayor medida el crecimiento de la levadura, superando a AtCIPK23. Por otra parte, AtCIPK9 también apareció entre las que activaban a AtHAK5 y esta quinasa había sido relacionada previamente con la nutrición de K<sup>+</sup> en las plantas de Arabidopsis (Pandey et al., 2007; Liu et al., 2013; Singh et al., 2018; Yadav et al., 2018). Teniendo en cuenta todo esto, se decidió llevar a cabo una caracterización más profunda del papel de las quinasas AtCIPK1 y AtCIPK9 en la activación de AtHAK5.

#### 4.1.2. Comprobación de la activación de AtHAK5 por AtCBL9

Los ensayos de complementación descritos en la Figura 16, se llevaron a cabo con el transportador AtHAK5 y el sensor AtCBL1. En trabajos previos (D'Angelo et al., 2006) se observó cómo AtCIPK1 interaccionaba fuertemente tanto con AtCBL1 como con AtCBL9. De igual modo, en resultados obtenidos por otros grupos, se describe la interacción de AtCIPK9 tanto con AtCBL1 como con AtCBL9 (Liu et al., 2013; Yadav et al., 2018). En base a esto, se decidió estudiar la capacidad de los complejos AtCIPK1/AtCBL9 y AtCIPK9/AtCBL9 para activar el transportador AtHAK5. Con este fin, se transformó la levadura 9.3 con el vector pYPGE15 que contenía el ADNc de AtCBL9, así como las quinasas AtCIPK1 o AtCIPK9 y el transportador AtHAK5 en los vectores mencionados anteriormente. Como control se utilizó la levadura que expresaba el complejo AtCIPK23/AtCBL9 junto con el transportador AtHAK5, puesto que la activación de este transportador por este complejo ya había sido descrita anteriormente (Ragel et al., 2015).

Los resultados mostraron que a altas concentraciones de K<sup>+</sup> (50 mM), todas las cepas de levadura crecieron bien (Figura 17). Por otra parte, en condiciones limitantes de K<sup>+</sup> (0,01 mM K<sup>+</sup>) (Figura 17), tanto AtCBL1 como AtCBL9 producían un crecimiento de la levadura similar cuando se expresaban junto con AtCIPK1 y AtHAK5. Sin embargo, la levadura que co-expresaba AtCBL1, AtCIPK9 y AtHAK5 mostró un crecimiento inferior a las anteriores, aunque similar al control AtCBL1/AtCIPK23. Al mismo tiempo, no se observó crecimiento en la levadura que expresaba el complejo AtCIPK9/AtCBL9.

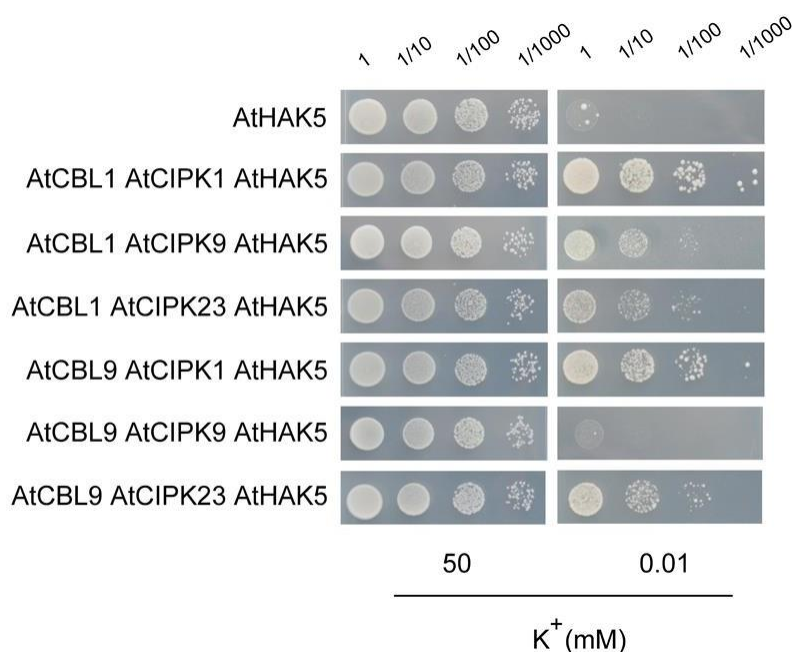


Figura 17. Ensayo de complementación en levadura expresando AtHAK5, AtCBL1, AtCBL9, AtCIPK1, AtCIPK9 y AtCIPK23. La cepa de levadura 9.3 se transformó con los vectores que contenían los ADNc de AtHAK5, AtCBL1, AtCBL9, AtCIPK1, AtCIPK9 y AtCIPK23. El experimento se llevó a cabo en medio mínimo PA suplementado con 0,01 o 50 mM de KCl. Se muestran 4 diluciones decimales seriadas de una suspensión de células de DO<sub>600</sub> igual a 1.

#### 4.1.3. Caracterización de la línea mutante *atcipk1*

Los resultados obtenidos en levadura, sugerían que AtCIPK1 regulaba la actividad del transportador AtHAK5. Para comprobar esta posible activación en la planta, se caracterizó el mutante de pérdida de función por inserción de ADN-T de *Arabidopsis atcipk1*. Mediante el estudio de esta línea, y la realización de experimentos de absorción de Rb<sup>+</sup> se caracterizó en qué medida esta proteína estaba implicada en la regulación de la absorción de K<sup>+</sup> en la planta.

Como ya se ha indicado en apartados anteriores, son dos los principales sistemas implicados en la absorción de K<sup>+</sup> en las plantas, AtHAK5 y AKT1, los cuales trabajan en rangos de concentraciones de K<sup>+</sup> externo diferentes. Sin embargo, ambos se activan mediante la proteína quinasa AtCIPK23. Por este motivo, para determinar si AtCIPK1 podría estar interaccionando además de con



AtHAK5 también con AKT1, se plantearon una serie de experimentos en los que se utilizaron las líneas mutantes simples de inserción de ADN-T *athak5*, *akt1* y *atcipk23*, y los dobles mutantes *athak5akt1*, *athak5atcipk23* y *akt1atcipk23*, las cuales se habían obtenido en trabajos previos del grupo de investigación (Ragel et al., 2015). Además, se realizaron los cruzamientos de la línea *atcipk1* con *athak5*, *akt1* y *atcipk23* para obtener los dobles mutantes *athak5atcipk1*, *akt1atcipk1*, y *atcipk1atcipk23*, y completar el estudio. La línea silvestre Col-0 también se utilizó en los experimentos.

Las plantas se crecieron en cultivo hidropónico con solución 1/5H (1,4 mM K<sup>+</sup>) durante 28 días para posteriormente ayunarlas de K<sup>+</sup> durante 12 días. Tras este periodo de ayuno, se realizó un experimento de absorción de Rb<sup>+</sup> con una concentración en el medio de 20 µM. Se fijaron estas condiciones experimentales para que mediante el estudio de todos los mutantes mencionados, poder esclarecer el efecto de AtCIPK1 sobre la actividad de AtHAK5, dado que, en estas condiciones, este transportador es el principal responsable de la entrada de Rb<sup>+</sup> en la planta.

#### 4.1.3.1. Efecto de la mutación *atcipk1* sobre la absorción de K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>)

A continuación, se muestra la absorción de Rb<sup>+</sup> en las distintas líneas mutantes de Arabidopsis (Figura 18). La ausencia de AtHAK5 produjo una reducción significativa del 86,5% en la absorción de Rb<sup>+</sup>, en comparación con la línea silvestre, lo cual era de esperar, puesto que como hemos comentado anteriormente, es este sistema el principal responsable de la absorción de Rb<sup>+</sup> en las condiciones experimentales empleadas (Nieves-Cordones et al., 2010). La ausencia del canal AKT1 no produjo una disminución de la absorción de Rb<sup>+</sup>, lo que confirmó el papel de AtHAK5 como principal sistema de absorción de K<sup>+</sup> en estas condiciones. La ausencia de AtCIPK1 o AtCIPK23 produjo una disminución en la entrada de Rb<sup>+</sup> de un 28,9 y un 47,1%, respectivamente, con respecto al genotipo silvestre. Los dobles mutantes *athak5atcipk1* y *athak5atcipk23* mostraron la misma tasa de entrada que el mutante simple *athak5*. La absorción de Rb<sup>+</sup> en los dobles mutantes *akt1atcipk1*, *akt1atcipk23* y *atcipk1atcipk23* fue similar a la que presentaron los mutantes simples *atcipk1* y *atcipk23*.

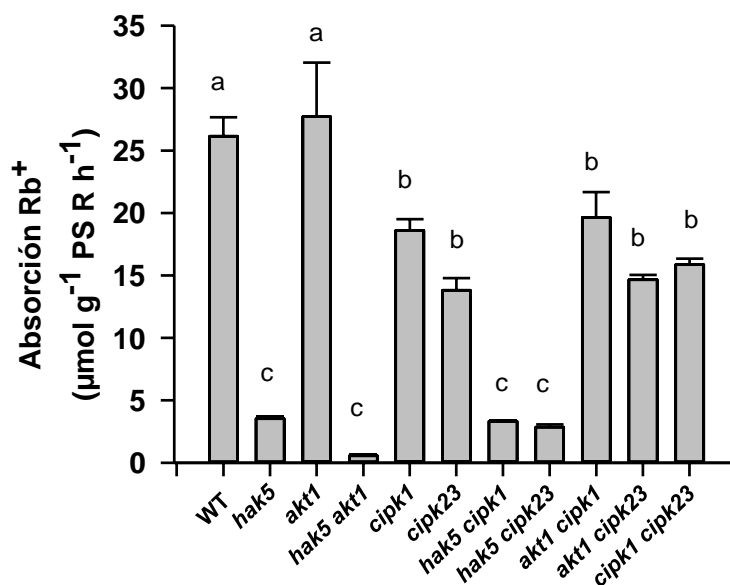


Figura 18. Experimento de absorción de Rb<sup>+</sup> en plantas ayunadas de K<sup>+</sup>. Se crecieron las plantas de las líneas que se muestran en la figura con solución 1,4 mM K<sup>+</sup> durante 28 días y seguidamente se ayunaron de K<sup>+</sup> durante 12 días. Tras el periodo de ayuno, se pasaron a una solución sin K<sup>+</sup> a la que se añadió Rb<sup>+</sup> a una concentración de 20 µM, manteniéndolas con este tratamiento durante 6 horas. Las plantas se separaron en parte aérea y raíz, se secaron y se realizó una digestión del material vegetal para determinar la concentración interna de Rb<sup>+</sup>. La tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> se calculó como el contenido de Rb<sup>+</sup> en el interior de la planta por unidad de peso seco de raíz y unidad de tiempo. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey.

#### 4.1.3.2. Efecto de la mutación *atcipk1* sobre el crecimiento de la planta

Los pesos secos de las plantas utilizadas en el experimento de absorción de Rb<sup>+</sup> se representan en la Figura 19 y Figura 20. Se observa que tanto el mutante simple *atcipk1*, como los dobles mutantes *athak5atcipk1*, *akt1atcipk1* y *atcipk1atcipk23*, presentaban un mayor peso seco, tanto en la parte aérea como en la raíz, que el genotipo silvestre.

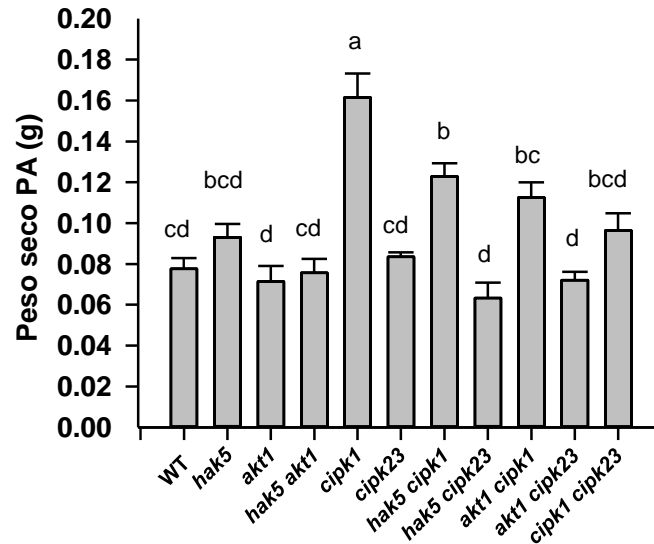


Figura 19. Peso seco de la parte aérea (g planta<sup>-1</sup>) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K<sup>+</sup>. Las plantas fueron cultivadas como se indica en la Figura 18. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey.

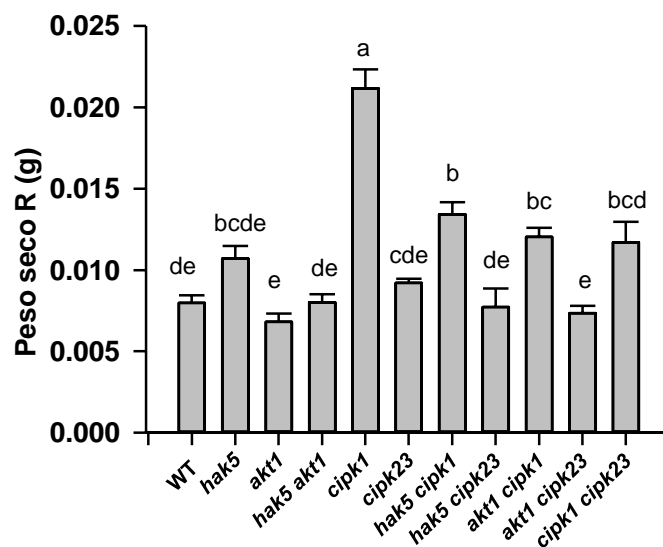


Figura 20. Peso seco de la raíz (g) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K<sup>+</sup>. Las plantas fueron cultivadas como se indica en la Figura 18. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey.

4.1.3.3. Efecto de la mutación *atcipk1* sobre la concentración de  $K^+$  en los órganos de la planta

Tras la digestión del material vegetal, también se determinaron las concentraciones de  $K^+$  de la raíz y de la parte aérea. En cuanto a las concentraciones de  $K^+$ , oscilaron entre 0,2 y 0,35  $\text{mmol g}^{-1}$  PS en la parte aérea (Figura 21) y entre 0,3 y 0,45  $\text{mmol g}^{-1}$  PS en la raíz (Figura 22). En el caso de la parte aérea, las líneas que presentaron una menor concentración de  $K^+$  fueron los dobles mutantes *athak5cipk1*, *akt1atcipk23* y *atcipk1atcipk23*. Para la raíz, las concentraciones más bajas se observaron en las líneas *atk1*, *akt1atcipk23* y *atcipk1atcipk23*.

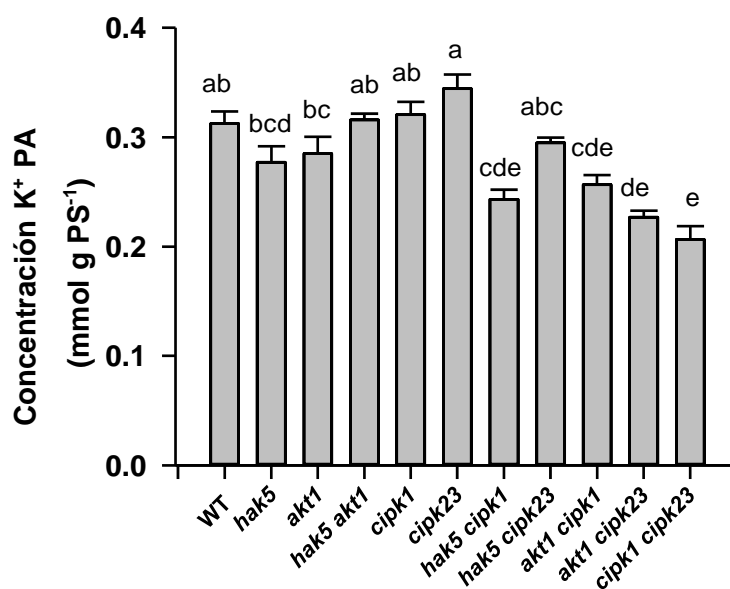


Figura 21. Concentraciones de  $K^+$  de la parte aérea ( $\text{mmol g PS}^{-1}$ ) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de  $K^+$ . Las plantas fueron cultivadas como se indica en la Figura 18. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

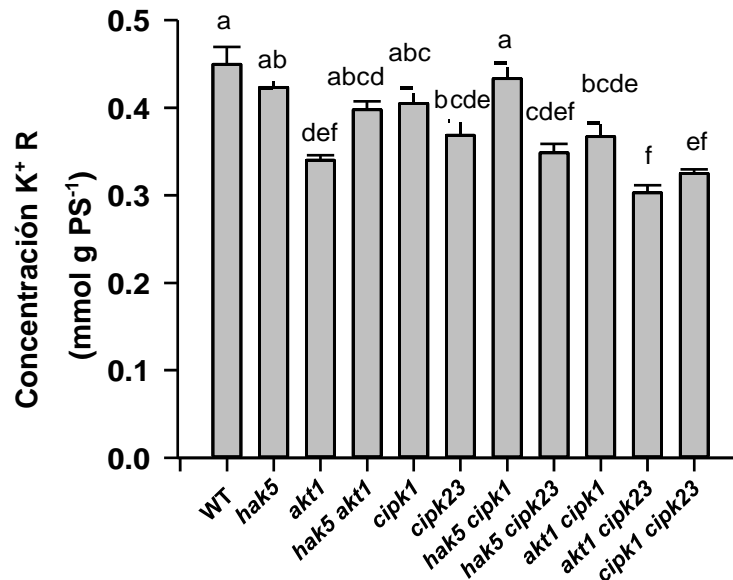


Figura 22. Concentraciones de K<sup>+</sup> de la raíz (mmol g PS<sup>-1</sup>) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K<sup>+</sup>. Las plantas fueron cultivadas como se indica en la Figura 18. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey.

#### 4.1.3.4. Efecto de la mutación *atcipk1* sobre la translocación de K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>)

La tasa de translocación de Rb<sup>+</sup> se calculó de acuerdo a lo explicado en el apartado de Materiales y Métodos. En la Figura 23 se representa la translocación de Rb<sup>+</sup> expresada en  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS raíz h}^{-1}$ . No se observaron diferencias significativas en la tasa de translocación de Rb<sup>+</sup> entre la línea silvestre y el mutante *akt1*, mientras que las líneas *atcipk1*, *atcipk23*, *akt1atcipk1*, *akt1athak5*, *akt1atcipk23* y *atcipk1atcipk23* presentaron valores semejantes entre sí. Las tasas más bajas de translocación las presentaron las líneas con mutaciones en el gen *AtHAK5*, tanto el mutante simple *athak5*, como los dobles mutantes *athak5atcipk1* y *athak5atcipk23*.

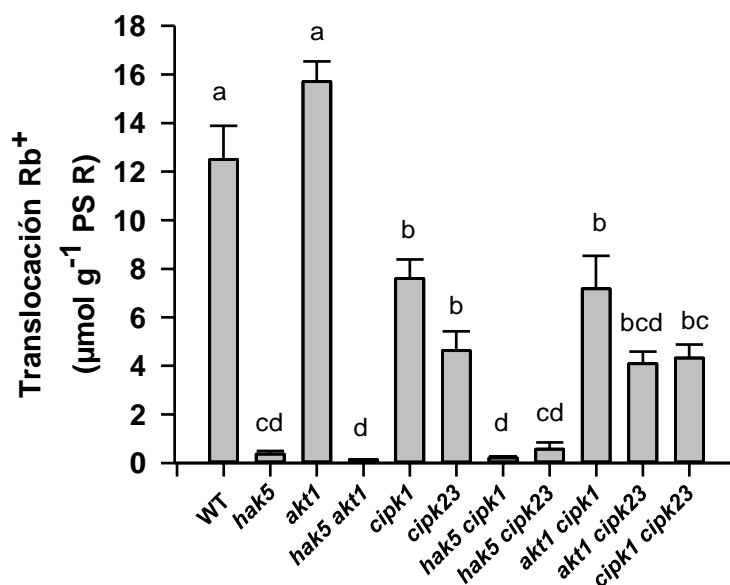


Figura 23. Tasa de translocación de Rb<sup>+</sup> a la parte aérea. Se crecieron las plantas de las líneas que se muestran en la figura con solución 1,4 mM K<sup>+</sup> durante 28 días y seguidamente se ayunaron de K<sup>+</sup> durante 12 días. Tras el periodo de ayuno, se pasaron a una solución sin K<sup>+</sup> a la que se añadió Rb<sup>+</sup> a una concentración de 20 µM, manteniéndolas con este tratamiento durante 6 horas. Las plantas se separaron en parte aérea y raíz, se secaron y se realizó una digestión del material vegetal para determinar la concentración interna de Rb<sup>+</sup>. La tasa de translocación se calculó como la cantidad de Rb<sup>+</sup> acumulada en la parte aérea por gramo de peso seco de raíz y unidad de tiempo. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P<0,05 según Test de Tukey.

#### 4.1.3.5. Efecto de la mutación *atcipk1* sobre la absorción de K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>) bajo estrés osmótico

En trabajos de otros grupos, se ha descrito que la proteína AtCIPK1 parece estar involucrada en la tolerancia de las plantas al estrés osmótico (D'Angelo et al., 2006). En el siguiente experimento se trató de establecer si dicha proteína jugaba un papel en la regulación de AtHAK5 en condiciones de dicho estrés. Para ello se utilizaron plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas mutantes de

inserción de ADN-T *athak5*, *atcipk1*, *atcipk23* y *akt1*, crecidas en cultivo hidropónico bajo condiciones control durante 15 días con 1/5H (1,4 mM K<sup>+</sup>) y posteriormente se ayunaron de K<sup>+</sup> durante 12 días. El estrés hiperosmótico se indujo mediante la adición de 300 mM de manitol a la solución de cultivo en dos días consecutivos, 150 mM cada uno de los días, correspondiendo con el undécimo y duodécimo día de ayuno. Un conjunto de plantas se ayunó en ausencia de manitol como control. Tras el tratamiento, se llevó a cabo un experimento de absorción de Rb<sup>+</sup> desde una concentración externa de 20 μM con el fin de estudiar la absorción de Rb<sup>+</sup> en el rango de alta afinidad a través de AtHAK5.

Los resultados mostraron como en ausencia de manitol, la tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> de los mutantes *atcipk1* y *atcipk23* fue aproximadamente un 50% inferior a la del genotipo silvestre. Como cabría esperar, el mutante *athak5* presentó una absorción de Rb<sup>+</sup> prácticamente nula y el mutante *akt1* no mostró diferencias significativas con respecto al silvestre, ya que el experimento se realizó en condiciones en las que el Rb<sup>+</sup> entra a la planta mayoritariamente a través de AtHAK5 (Figura 24).

En presencia de manitol, la entrada de Rb<sup>+</sup> se redujo drásticamente en todas las líneas, no observándose diferencias significativas entre el mutante *atcipk1* y el genotipo silvestre. Sin embargo, el resto de las líneas mutantes presentaron una absorción significativamente menor que la silvestre y *atcipk1*. Por lo tanto, se comprobó como la falta de la quinasa AtCIPK1 no afectó a la absorción de Rb<sup>+</sup> en condiciones de estrés osmótico.

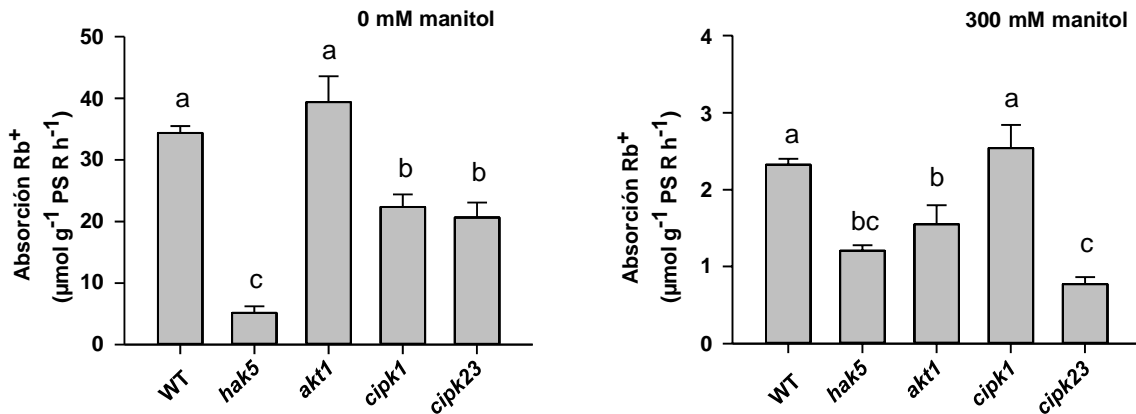


Figura 24. Absorción de Rb<sup>+</sup> en plantas ayunadas de K<sup>+</sup> en condiciones de estrés osmótico. Se crecieron las plantas de las líneas que se muestran en la figura con solución 1,4 mM K<sup>+</sup> durante 28 días y seguidamente se ayunaron de K<sup>+</sup> durante 12 días. El tratamiento de estrés osmótico se realizó mediante la adición de manitol a una concentración final de 300 mM. Para ello, se añadió manitol a la solución nutritiva en los días 11 y 12 de ayuno de K<sup>+</sup> a razón de 150 mM cada día. Tras el periodo de ayuno y tratamiento con manitol, se pasaron a una solución sin K<sup>+</sup> ni manitol a la que se añadió Rb<sup>+</sup> a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  manteniéndolas con este tratamiento durante 6 horas. La parte aérea y la raíz se cosecharon y secaron para finalmente llevar a cabo la digestión del material vegetal y determinar la concentración interna de Rb<sup>+</sup>. La tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> se calculó como el contenido de Rb<sup>+</sup> en el interior de la planta por unidad de peso seco de raíz y unidad de tiempo. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

#### 4.1.4. Caracterización de la línea mutante *atcipk9*

En el experimento inicial de complementación en levadura en el que se estudiaron cada una de las 26 AtCIPKs, se comprobó que el transportador AtHAK5 era activado por el complejo AtCIPK9/AtCBL1 (Figura 16). Como se ha mencionado anteriormente, este resultado está de acuerdo con los obtenidos por otros grupos en los que se describe la implicación de AtCIPK9 en la nutrición de K<sup>+</sup> en plantas (Pandey et al., 2007; Liu et al., 2013; Singh et al., 2018; Yadav et al., 2018). Por este motivo se decidió estudiar la implicación de esta quinasa en la activación de AtHAK5. Para ello se utilizó la línea mutante de inserción de ADN-



T *atcipk9* y se llevaron a cabo experimentos de absorción de  $Rb^+$  en el rango de alta afinidad ( $20 \mu M$ ). En este estudio, también se incluyeron las líneas *athak5*, *atcipk23* y el genotipo silvestre Col-0 para utilizarlas como controles del experimento.

#### 4.1.4.1. Efecto de la mutación *atcipk9* sobre la absorción de $K^+$ ( $Rb^+$ )

Tras 28 días de cultivo en hidropónico con solución control con 1/5H ( $1,4 \text{ mM } K^+$ ) y un ayuno de  $K^+$  de 12 días en solución sin  $K^+$ , las plantas se utilizaron para un experimento de absorción de  $Rb^+$ , observándose un comportamiento similar en las líneas *atcipk9* y *atcipk23*, que en ambos casos presentaban una tasa de entrada de  $Rb^+$  menor que el genotipo silvestre. Esta disminución de la entrada de  $Rb^+$  fue significativamente mayor en el mutante *atcipk9* (55%) que en *atcipk23* (39%) (Figura 25).

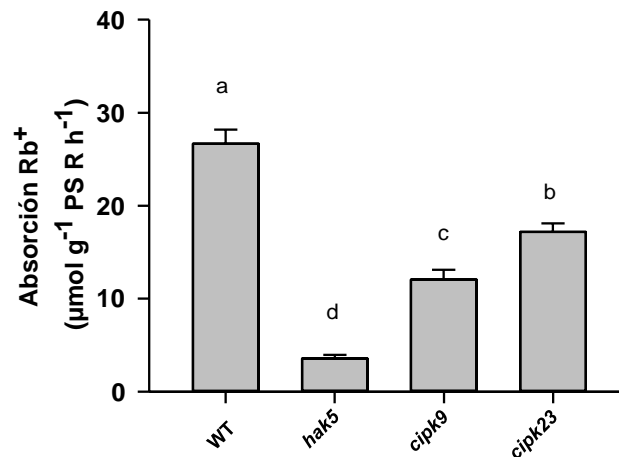


Figura 25. Absorción de  $Rb^+$  en plantas ayunadas de  $K^+$ . Las plantas de las líneas que se muestran en esta figura fueron cultivadas y procesadas como se indica en la Figura 18. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

#### 4.1.4.2. Efecto de la mutación *atcipk9* sobre el crecimiento de la planta

El peso seco de la parte aérea y de la raíz de las plantas utilizadas en el experimento de absorción de  $Rb^+$  se representa en la Figura 26. Se observaron diferencias importantes en el tamaño de la línea mutante *atcipk9* respecto al resto de líneas estudiadas. El tamaño de la parte aérea de la línea *atcipk9* fue aproximadamente un 33% inferior al del genotipo silvestre y un 50% menor que la línea *atcipk23*. En cuanto a la raíz, también se observan valores significativamente menores en el peso seco de la línea *atcipk9* respecto a las líneas *athak5* y *atcipk23*.

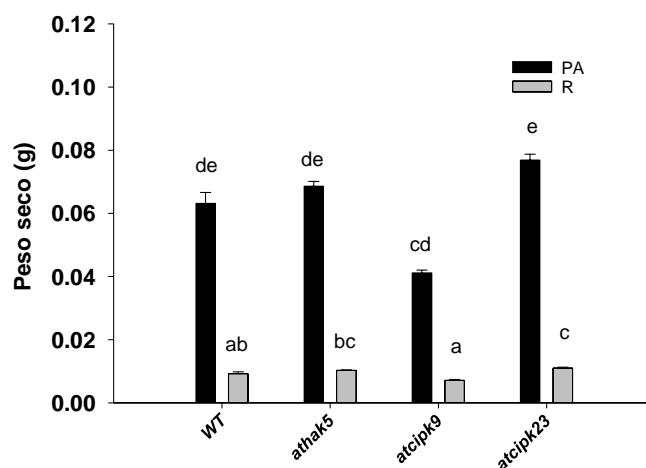


Figura 26. Peso seco de la parte aérea y raíz ( $g \cdot planta^{-1}$ ) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de  $K^+$ . Las plantas de las líneas que se muestran en esta figura fueron cultivadas y procesadas de igual forma que en la Figura 18. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

#### 4.1.4.3. Efecto de la mutación *atcipk9* sobre la concentración de $K^+$ en los órganos de la planta

En cuanto a las concentraciones de  $K^+$  en los órganos de la planta (Figura 27), se observó cómo la parte aérea de la línea *atcipk9* presentaba una concentración de este elemento significativamente más alta que el resto de las

líneas, sin embargo, en la raíz, aunque se observa esta misma tendencia, las diferencias no eran estadísticamente significativas.

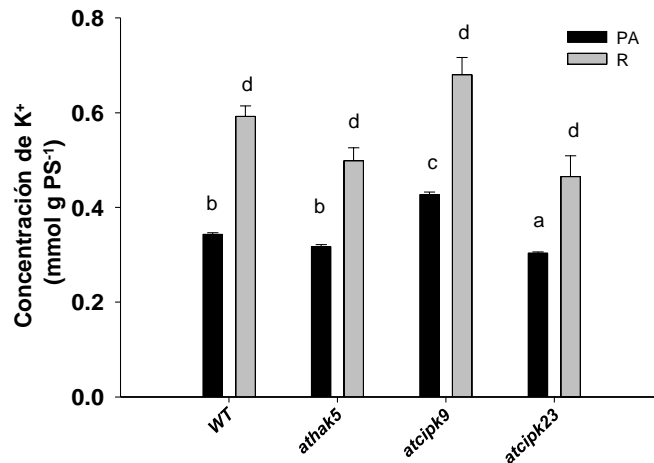


Figura 27. Concentraciones de K<sup>+</sup> de la parte aérea y de la raíz (mmol g PS<sup>-1</sup>) de las distintas líneas mutantes estudiadas tras el tratamiento de ayuno de K<sup>+</sup>. Las plantas de las líneas que se muestran en esta figura fueron cultivadas y procesadas de igual forma que en la Figura 18. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P < 0,05 según el Test de Tukey.

#### 4.1.4.4. Efecto de la mutación *atcipk9* sobre la translocación de K<sup>+</sup>

En la Figura 28 se representa la tasa de translocación de Rb<sup>+</sup>. Como se puede observar, los valores de translocación de Rb<sup>+</sup> de las líneas WT, *athak5* y *atcipk23* utilizadas como control del experimento, presentan valores semejantes a los obtenidos en el experimento anterior con los distintos mutantes de *AtCIPK1* (Figura 23). En este caso, el mutante *atcipk9* presenta una tasa de translocación de Rb<sup>+</sup> de aproximadamente 4 μmol g<sup>-1</sup>PS de raíz, menor que la presentada por la línea silvestre y el mutante *atcipk23*.

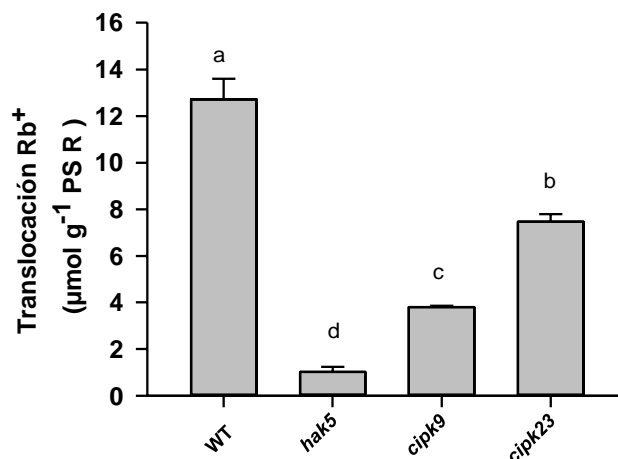


Figura 28. Tasa de translocación de Rb<sup>+</sup> a la parte aérea. Las plantas de las líneas que se muestran en esta figura fueron cultivadas y procesadas de igual forma que en la Figura 18. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

#### 4.1.5. Relación entre la tasa de absorción de K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>) y la translocación de éste a la parte aérea para cada una de las líneas estudiadas

En estudios previos se ha puesto de manifiesto que existe una correlación entre la tasa de absorción de K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>) en la planta y la tasa de translocación a la parte aérea (Nieves-Cordones et al., 2019). Si se representa el contenido relativo de K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>) en la parte aérea frente a la tasa de absorción en una planta, los datos se pueden ajustar a una ecuación hiperbólica. En una planta WT, en la que ni la absorción ni la translocación de K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>) están modificados por ninguna mutación, se obtiene un ajuste de los datos determinado y una curva de ajuste de forma característica. Si los datos de una línea mutante en un sistema de transporte de K<sup>+</sup>, representados de forma similar, se desvían del ajuste de la línea WT, se puede decir que la línea mutante puede estar afectada de forma específica, además de en la absorción de K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>), en la translocación de K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>), y que el sistema de transporte de K<sup>+</sup> puede participar tanto en la absorción como en la translocación del mismo.

Los resultados mostrados anteriormente con las líneas *atcipk1* y *atcipk9* muestran que dichas mutaciones dan lugar a una menor tasa tanto de absorción

como de translocación de  $\text{Rb}^+$ . Por lo dicho en el párrafo anterior, la menor tasa de translocación podía ser debida a una menor tasa de absorción porque las quinasas estarían regulando los sistemas de absorción de  $\text{K}^+$  ( $\text{Rb}^+$ ). Sin embargo, también era posible que las quinasas estuvieran regulando la translocación de  $\text{K}^+$  ( $\text{Rb}^+$ ) a la parte aérea. Para distinguir entre estas dos posibilidades se analizaron los datos de absorción y translocación de  $\text{K}^+$  ( $\text{Rb}^+$ ) según lo descrito en anteriormente. Para este análisis se realizaron experimentos de absorción de  $\text{Rb}^+$  con la línea Col-0 a distintas concentraciones de  $\text{Rb}^+$  (0; 0,02; 0,2 y 1 mM de  $\text{Rb}^+$ ) con plantas ayunadas de  $\text{K}^+$ . Se incluyó la línea *akt1athak5* como control ya que se ha descrito que dicha línea tiene una mayor eficiencia de translocación de  $\text{K}^+$  ( $\text{Rb}^+$ ) y la correlación entre el  $\text{Rb}^+$  translocado y la absorción del mismo difiere de la de la línea silvestre. Se calcularon las tasas de absorción de  $\text{Rb}^+$  y el porcentaje de  $\text{Rb}^+$  en la parte aérea con respecto al total de la planta. Se representaron estos valores, y se ajustaron a una línea de tendencia para cada uno de los genotipos. Cada uno de estos valores representados en la gráfica se correspondía con la media de tres repeticiones biológicas (Figura 29). Para el genotipo silvestre, a medida que aumenta la tasa neta de absorción de  $\text{Rb}^+$ , también lo hace el porcentaje que se moviliza a la parte aérea. Esto ocurre de igual manera en el mutante *athak5akt1*, sin embargo, se observa cómo para tasas de absorción bajas, la capacidad de translocación de  $\text{Rb}^+$  del mutante *athak5akt1* es mucho mayor que la del genotipo silvestre, siendo por tanto más eficiente en la translocación de  $\text{Rb}^+$  desde la raíz a la parte aérea. Estos resultados estaban de acuerdo con lo descrito anteriormente para estas líneas (Nieves-Cordones et al., 2019).

Los resultados indican grandes diferencias entre las dos líneas silvestre y *athak5akt1*, ya que en la línea silvestre para una absorción de  $\text{Rb}^+$  de  $20 \mu\text{mol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$ , la translocación de  $\text{Rb}^+$  a la parte aérea fue alrededor del 30 % del total, mientras que para el mutante *athak5akt1* fue de más del 60 %. Es decir, la línea doble mutante *athak5akt1*, a valores de absorción de  $\text{Rb}^+$  menores de  $50 \mu\text{mol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$ , presenta una mayor translocación que la línea silvestre.

Seguidamente, se llevaron a cabo las mismas determinaciones para las líneas mutantes estudiadas en esta Tesis Doctoral en los experimentos de caracterización de las líneas *atcipk1* y *atcipk9*. Se calcularon los porcentajes de translocación  $\text{Rb}^+$  desde la raíz a la parte aérea, expresándose como el porcentaje

de  $Rb^+$  en la parte aérea respecto al total que contiene la planta y se representaron en la gráfica junto con los valores de los experimentos previos de las líneas WT y *athak5akt1*. Los resultados indican que, con excepción de la línea *atcipk9*, el resto de las líneas se comportan como el genotipo silvestre, por lo que el fenotipo de estas líneas no se debía a una alteración en la translocación, sino únicamente en la absorción de  $Rb^+$ . La línea *atcipk9* se desvió ligeramente de la tendencia del genotipo silvestre, presentando una eficiencia de translocación mayor que el resto de las líneas, aunque menor que la del doble mutante *athak5akt1*.

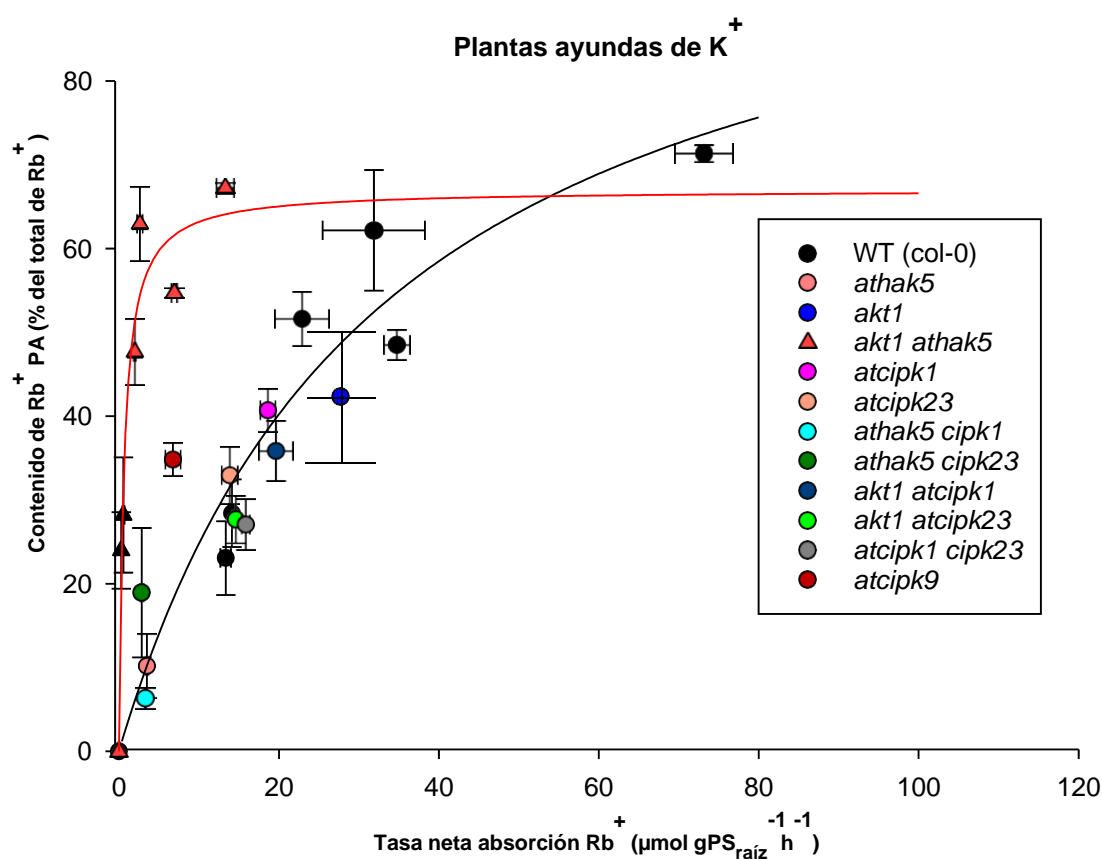


Figura 29. Relación entre el porcentaje de  $Rb^+$  en la parte aérea y la tasa de absorción de  $Rb^+$ . Se utilizaron los datos obtenidos de los experimentos de absorción y transporte de  $Rb^+$  para cada una de las líneas mutantes estudiadas. Los datos del genotipo silvestre Col-0 y el mutante *akt1athak5*, se ajustaron a una ecuación hiperbólica (línea negra para Col-0 y roja para *akt1athak5*) obteniendo un valor de  $R^2$  de 0,93 para la primera y 0,95 para la segunda.

#### 4.1.6. Niveles de Expresión de los genes *AtCIPK1*, *AtCIPK9* y *AtCIPK23*

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína *AtCIPK23* activa el transportador de  $K^+$  de alta afinidad *AtHAK5*. El gen *AtCIPK23*, el cual codifica dicha proteína, se induce en condiciones de deficiencia de  $K^+$  (Xu et al., 2006). Para profundizar en el estudio del papel de las quinasas *AtCIPK1* y *AtCIPK9* en la regulación de la entrada de  $K^+$  a través de *AtHAK5*, se procedió a determinar la expresión de los genes *AtCIPK1* y *AtCIPK9* en condiciones de deficiencia de  $K^+$ .

Para ello se crecieron en cultivo hidropónico durante 28 días las plantas de *Arabidopsis* de la línea silvestre Col-0 junto con las líneas mutantes de inserción de ADN-T *atcipk1*, *atcipk9* y *atcipk23* bajo condiciones control con 1/5H (1,4 mM  $K^+$ ) y posteriormente se ayunaron de  $K^+$  durante 12 días, mientras que un grupo de las mismas se mantuvo con  $K^+$  como tratamiento control. Seguidamente se congelaron las raíces en nitrógeno líquido y se llevó a cabo la extracción de ARN y posterior síntesis de ADNc para así cuantificar los niveles de ARNm de los genes *AtCIPK1* y *AtCIPK9* por PCR en tiempo real (qPCR). La expresión del gen *AtCIPK23* se cuantificó en el experimento como control.

Los resultados mostraron que en las plantas silvestres el ayuno de  $K^+$  daba lugar a la inducción tanto de *AtCIPK1*, *AtCIPK9* y *AtCIPK23*, siendo *AtCIPK9* el que presentaba una mayor inducción (Figura 30). También se determinó la expresión de estos tres genes en las líneas mutantes *atcipk1*, *atcipk9* y *atcipk23* con el objetivo de estudiar si podía existir algún efecto compensatorio cuando se eliminaba uno de ellos por sobreexpresión de los otros dos que estaban presentes. Se observó que no existía un efecto compensatorio en ninguna de las líneas mutantes, puesto que no se apreció una sobreexpresión de ninguno de estos genes en los mutantes estudiados respecto al nivel de expresión del genotipo silvestre en condiciones de ayuno de  $K^+$ .

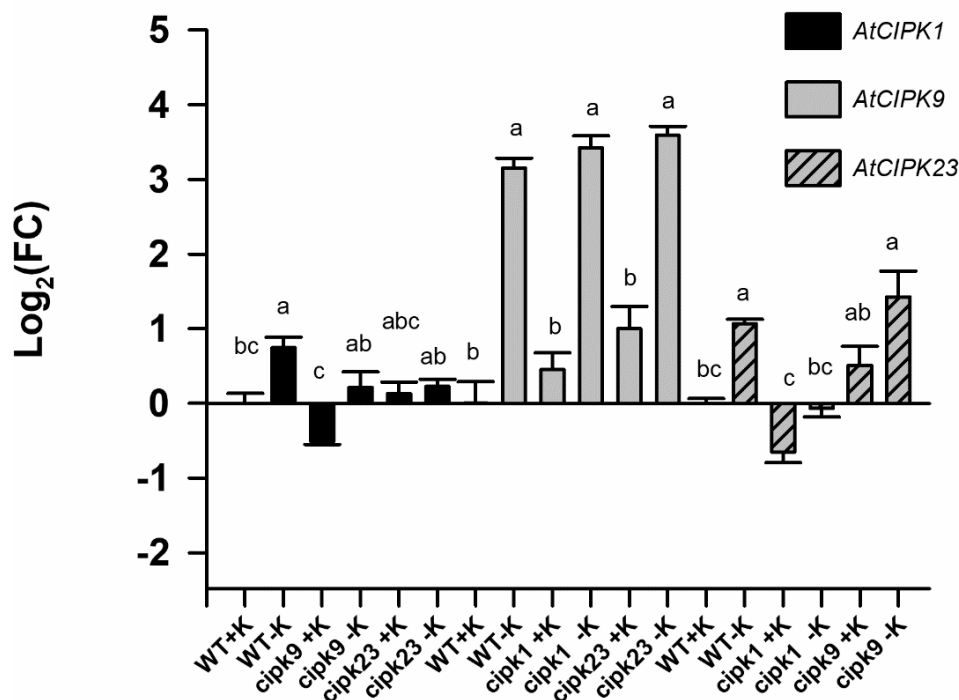


Figura 30. Niveles de expresión de los genes *AtCIPK1*, *AtCIPK9* y *AtCIPK23* en raíces de plantas WT Col-0, *atcipk1*, *atcipk9* y *atcipk23* en respuesta al ayuno de K<sup>+</sup>. Mediante el empleo de PCR en tiempo real se determinaron los valores de expresión relativa del gen *AtCIPK1* (barras negras), *AtCIPK9* (barras grises) y *AtCIPK23* (barras grises rayadas) tras ayunar las plantas de K<sup>+</sup> durante 12 días respecto a las plantas control, mantenidas en solución nutritiva completa. Los niveles de expresión se muestran como el Log<sub>2</sub> de *Fold Change* para cada gen estudiado respecto la muestra calibradora WT más K<sup>+</sup> según el método comparativo del  $\Delta\Delta C_T$ . Se muestra el promedio de 6 repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes para cada gen indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

#### 4.1.7. Niveles de expresión de *AtHAK5*

También se estudiaron los niveles de expresión del gen *AtHAK5* en cada una de las líneas mutantes *atcipk1*, *atcipk9* y *atcipk23*. Para la cuantificación del gen *AtHAK5* mediante qPCR se emplearon las mismas muestras de ADNc que en el experimento anterior. Tal y como está descrito en trabajos anteriores, el gen *AtHAK5* se induce de forma significativa en la raíz de *Arabidopsis* en respuesta a la falta de K<sup>+</sup> (Gierth et al., 2005; Nieves-Cordones et al., 2010). Los resultados



mostraron que el gen *AtHAK5* se inducía fuertemente por ayuno de  $K^+$  en todas las líneas. La inducción de este gen era similar en las líneas mutantes *atcipk1* y *atcipk23* con respecto al genotipo silvestre para plantas ayunadas de  $K^+$  (Figura 31). Sin embargo, en plantas *atcipk9*, el nivel de expresión de *AtHAK5* resultó ligeramente inferior al del resto de líneas estudiadas. Esto demostró que las mutaciones de *AtCIPK1* y *AtCIPK23* no afectaron negativamente a la inducción de *AtHAK5* en estas condiciones, mientras que la mutación de *AtCIPK9*, sí que podía estar afectando negativamente a la expresión de *AtHAK5*.

En plantas sin ayunar de  $K^+$ , también se pudieron observar diferencias en la expresión de *AtHAK5*. En este caso el nivel de expresión de *AtHAK5* en el mutante *atcipk23* resultó significativamente superior a la del mutante *atcipk1*.

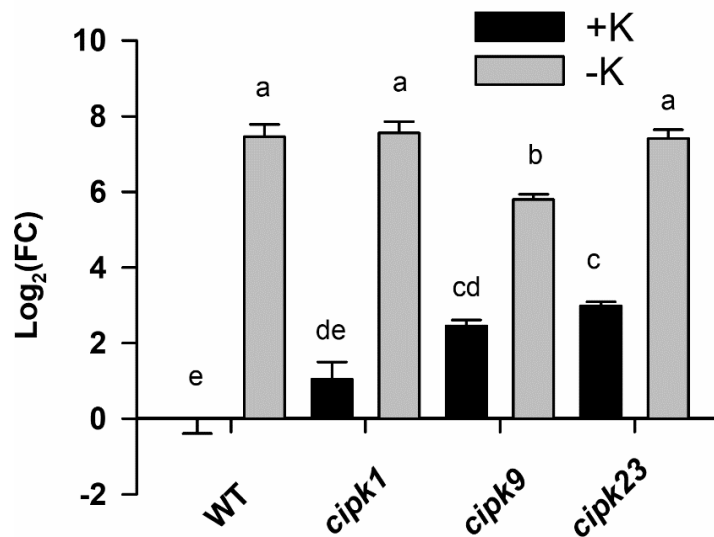


Figura 31. Niveles de expresión del gen *AtHAK5* en raíces de plantas WT Col-0, *atcipk1*, *atcipk9* y *atcipk23* en respuesta al ayuno de  $K^+$ . Mediante el empleo de la PCR en tiempo real se determinaron los valores de expresión relativa del gen *AtHAK5* en plantas ayunadas de  $K^+$  (- $K^+$ , barras grises) y en plantas cultivadas en solución completa (+ $K^+$ , barras negras) respecto a las plantas control WT+ $K^+$ . Los niveles de expresión se muestran como el  $\text{Log}_2$  de *Fold Change* en los genes estudiados respecto la muestra calibradora WT más  $K^+$  según el método comparativo del  $\Delta\Delta C_T$ . Se muestra el promedio de 6 repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

#### 4.1.8. Discusión

El transportador de  $K^+$  de alta afinidad AtHAK5 es el principal sistema de absorción de  $K^+$  en raíz de *Arabidopsis* cuando la concentración externa de  $K^+$  es inferior a  $20 \mu M$  (Nieves-Cordones et al., 2016) (Figura 8). Por ello, el funcionamiento de este transportador es de vital importancia para garantizar un suministro de  $K^+$  a la planta cuando las concentraciones de este elemento son limitantes. Uno de los mecanismos implicados en la activación de AtHAK5 es la fosforilación del transportador por la quinasa AtCIPK23 (Ragel et al., 2015). Dicha quinasa, además de mediar en la activación de AtHAK5, está implicada en la activación de varios sistemas de absorción de nutrientes distintos del  $K^+$ , como por ejemplo  $NO_3^-$  (Ho et al., 2009),  $NH_4^+$  (Straub et al., 2017) o  $Fe^{2+}$  (Tian et al., 2016; Dubeaux et al., 2018). Esto demuestra que una misma quinasa puede regular sistemas de transporte implicados en la adquisición de diferentes nutrientes y el papel de AtCIPK23 parece ser central en la regulación de la nutrición mineral de plantas. Por otra parte, también se ha descrito que un mismo sistema de transporte puede ser activado por diferentes quinasas de la familia AtCIPK. Este es por ejemplo el caso del canal de  $K^+$  AKT1, el cual puede ser activado por las quinasas AtCIPK6, AtCIPK16 y AtCIPK23 (Lee et al., 2007). Por todo ello, la modulación de la actividad de los sistemas implicados en la adquisición de nutrientes en las raíces de las plantas parece estar mediada por una compleja red formada por múltiples elementos.

Con el fin de obtener más información sobre los elementos de la red de regulación implicados en la activación de AtHAK5, se partió del trabajo previo del grupo, el cual había sido publicado en la Tesis Doctoral de Reyes Ródenas (Ródenas, 2019), en el que se estudió la capacidad de cada una de las 26 AtCIPKs de *Arabidopsis* para activar el transporte de  $K^+$  a través de AtHAK5. Para ello se caracterizó el crecimiento de levaduras que coexpresaban el transportador de  $K^+$  AtHAK5, el sensor de  $Ca^{2+}$  AtCBL1 y cada una de las 26 AtCIPK de *Arabidopsis*. Los resultados de este trabajo sugirieron que más de una AtCIPK era capaz de activar el transportador AtHAK5 y permitir el crecimiento de la levadura en condiciones de bajo  $K^+$  en el medio. Para estudiar si existía alguna relación entre la capacidad de activar AtHAK5 y el grupo filogenético al que pertenecía cada AtCIPK, se agruparon los resultados de complementación en levadura de acuerdo

con un árbol filogenético de la familia de estas proteínas quinasas (Figura 16). Se observó que no existía una relación clara entre la capacidad de cada AtCIPK para promover el crecimiento de la levadura y el grupo filogenético al que pertenecía cada AtCIPK dentro de la familia AtCIPK. Así, se observó que, dentro de un mismo grupo filogenético, los niveles de complementación mediados por cada quinasa resultaban diferentes. Este resultado, apoya la idea de que, aunque la filogenia proporciona una información muy valiosa sobre la posible función de una proteína, dicha función no se puede determinar directamente de sus relaciones filogenéticas, y que son necesarias pruebas funcionales para lograr dicho propósito. Del experimento de complementación funcional en levadura con las 26 AtCIPKs de Arabidopsis, se seleccionaron AtCIPK1 y AtCIPK9 para llevar a cabo una caracterización más detallada del papel de las mismas en la regulación de AtHAK5. Se seleccionaron estas dos quinasas porque AtCIPK1 produjo en la levadura el mejor crecimiento de todas las AtCIPK ensayadas (Figura 16) y AtCIPK9 se había relacionado en trabajos previos con la regulación de la nutrición de  $K^+$  en las plantas de Arabidopsis (Pandey et al., 2007; Liu et al., 2013; Singh et al., 2018; Yadav et al., 2018).

En la bibliografía se describe que tanto AtCIPK1 (D'Angelo et al., 2006) como AtCIPK9 (Yadav et al., 2018), (Liu et al., 2013), además de interactuar con AtCBL1 también lo hacen con AtCBL9. En la Figura 17 se muestra cómo, además del complejo AtCIPK1/AtCBL1, el complejo AtCIPK1/AtCBL9, también produce la activación de AtHAK5 en condiciones de bajo  $K^+$ . Esto sin embargo no ocurre para el complejo AtCIPK9/AtCBL9. Los dos sensores de  $Ca^{2+}$ , AtCBL1 y AtCBL9, activan AtHAK5 (Ragel et al., 2015), así como el canal AKT1 (Xu et al., 2006), a través de la quinasa AtCIPK23. Vale la pena resaltar que el canal AKT1 no se activa por AtCIPK1 (Lee et al., 2007). Todos estos resultados sugieren que es probable que diferentes combinaciones de AtCBLs y AtCIPKs compongan distintos complejos reguladores capaces de modular la absorción de  $K^+$  en la raíz de la planta a través de la activación de AtHAK5 y AKT1. Los dos sensores de  $Ca^{2+}$ , AtCBL1 y AtCBL9, junto con las dos proteínas quinasas, AtCIPK1, AtCIPK9 así como AtCIPK23, resultan piezas clave en la regulación de la absorción de  $K^+$ . Dado que nuestro primer análisis se llevó a cabo empleando AtCBL1, no se puede descartar que alguna otra AtCBL distinta de AtCBL1, pueda activar AtHAK5 en

combinación con alguna de las AtCIPK estudiadas en el experimento inicial y que no produjeron crecimiento de la levadura.

Los resultados de la activación de AtHAK5 en levadura por AtCIPK1 (Figura 17), y la inducción transcripcional del gen *AtCIPK1* en las raíces de *Arabidopsis* en respuesta al ayuno de  $K^+$  (Figura 30), en las mismas condiciones en las que se activaba la transcripción de AtHAK5 (Figura 31) sugerían un papel para esta quinasa en la regulación de la absorción de  $K^+$  de alta afinidad mediada por AtHAK5. Los resultados obtenidos con el estudio de las líneas mutantes de inserción de ADN-T confirmaron dicho papel en plantas. En las condiciones experimentales utilizadas, AtHAK5 es el principal responsable de la absorción de  $Rb^+$  (Pyo et al., 2010; Nieves-Cordones et al., 2019). La mutación *atcipk1* redujo la tasa de absorción de  $Rb^+$  de alta afinidad en un 28,9% con respecto al genotipo silvestre (Figura 18). La eliminación de AtCIPK1 en la línea *akt1* (línea *akt1atcipk1*), en la que el único sistema de absorción de  $Rb^+$  es AtHAK5, redujo un 32,9% la tasa de absorción de  $Rb^+$  y no tuvo efecto cuando AtCIPK1 se mutó en el fondo *athak5* (línea *athak5atcipk1*). Estos resultados, demostraron que AtCIPK1 estaba regulando la absorción de  $Rb^+$  de alta afinidad mediada por AtHAK5. Esta regulación se produjo a nivel post-transcripcional, afectando a la actividad de la proteína AtHAK5, ya que la eliminación de AtCIPK1 no tuvo ningún efecto sobre la inducción transcripcional del gen *AtHAK5* producida por el ayuno de  $K^+$  (Figura 31).

Estudios previos han demostrado la importancia de AtCIPK1 en la tolerancia a estrés osmótico (D'Angelo et al., 2006). Al formar complejos alternativos con AtCBL1 y AtCBL9, la quinasa podría regular respuestas independientes y dependientes de ABA en condiciones de estrés abiótico. Se demostró que estos complejos estaban ubicados en la membrana plasmática, donde, según lo sugerido por estos autores, regularían un sistema de transporte iónico de la membrana plasmática. Sin embargo, en este estudio (D'Angelo et al., 2006) no se identificó un objetivo final para la proteína quinasa. En esta Tesis Doctoral, presentamos evidencias fisiológicas y genéticas que demuestran que AtCIPK1 regula la actividad del transportador AtHAK5. La regulación del transportador de  $K^+$  parece no estar relacionada con el papel de AtCIPK1 en la tolerancia al estrés osmótico, ya que no pudimos observar un efecto de AtCIPK1

en la absorción de  $K^+$  mediada por AtHAK5 en condiciones de estrés hiperosmótico (Figura 24).

AtCIPK9 (Pandey et al., 2007; Liu et al., 2013; Singh et al., 2018), junto con AtCIPK23 (Ragel et al., 2015), ha sido relacionada con el mantenimiento de la nutrición de  $K^+$  de la planta. Estos trabajos sobre AtCIPK9 sugirieron que, además de otros procesos, la absorción de  $K^+$  en la raíz de la planta podría ser modulada por la proteína quinasa AtCIPK9. Se proponía la existencia de un transportador de  $K^+$  como objetivo final de la quinasa AtCIPK9, pero este punto quedaba en la especulación y no se llegaba a identificar ningún sistema de transporte. Como se observó para AtCIPK23 (Xu et al., 2006) y en este trabajo para AtCIPK1 (Figura 30), se había observado la inducción del gen que codifica AtCIPK9 por ayuno de  $K^+$  (Pandey et al., 2007), lo que también se observa en los resultados de esta Tesis Doctoral (Figura 9). En los ensayos de complementación en levaduras previos (Rodenas, 2019) y de esta Tesis Doctoral (Figuras 16 y 17) se demuestra que AtCIPK9 activaba la absorción de  $K^+$  mediada por AtHAK5 en levadura. En los estudios posteriores realizados con la línea de Arabidopsis mutante *atcipk9* se observaba una disminución del 55% en la tasa de absorción de  $Rb^+$  de alta afinidad, en condiciones en las que AtHAK5 es el principal responsable de la absorción de  $K^+$  (Figura 25). Por todo ello, los resultados de esta Tesis Doctoral indican que AtCIPK9 está implicada en la regulación de la absorción de  $K^+$  mediada por AtHAK5. Este podría ser el motivo por el cual las plantas de la línea *atcipk9* eran tan sensibles a la deficiencia de  $K^+$  (Pandey et al., 2007).

Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral y en trabajos previos (Ragel et al., 2015) muestran claramente la regulación del transporte de  $K^+$  de alta afinidad mediado por AtHAK5 por las quinasas AtCIPK1, AtCIPK9 y AtCIPK23. Estas tres quinasas actúan junto con el sensor de  $Ca^{2+}$  AtCBL1 y AtCIPK1, así como AtCIPK23, también lo hacen junto con el sensor AtCBL9.

Los eventos de fosforilación parecen ser un mecanismo importante de la regulación del transportador AtHAK5, así como de otros transportadores de la familia. Por ejemplo, se ha descrito que el transportador AtKUP7, implicado en la absorción y translocación de  $K^+$  en Arabidopsis, presenta tres sitios de fosforilación implicados en la regulación de su actividad, aunque no se ha identificado todavía ninguna quinasa implicada en dichas fosforilaciones (Han et

al., 2016). En la secuencia del transportador AtHAK5 existen varios residuos que podrían ser fosforilados por AtCIPK1, AtCIPK9 o AtCIPK23. Esta última fosforila AtHAK5 en su dominio N-terminal, pero aún no se ha identificado el residuo o los residuos concretos que son fosforilados por esta quinasa. Todo esto ilustra la gran complejidad que existe en la regulación de un único sistema de absorción de  $K^+$ . Dicha complejidad probablemente responde a la necesidad de la planta de hacer frente a distintas condiciones ambientales para asegurar el suministro de  $K^+$ . En este momento, con la información disponible, no se pueden apuntar condiciones particulares en las que actúe cada una de las quinasa tres quinasa, AtCIPK1, AtCIPK9 o AtCIPK23 estudiadas en esta Tesis Doctoral, de forma mayoritaria. Tampoco es posible establecer cuál de estas tres quinasa juega un papel más preponderante en la regulación de AtHAK5. Es cierto que los estudios con las líneas mutantes *atcipk1*, *atcipk9* y *atcipk23* muestran una reducción importante de la entrada de  $Rb^+$  como consecuencia de la falta de cada quinasa. Esta reducción es distinta en cada una de las líneas, observándose disminuciones de la entrada de  $Rb^+$  del 28,9, 55 y 47,1 % (Figura 18 y Figura 25) en las líneas *atcipk1*, *atcipk9* y *atcipk23* respectivamente. De estos porcentajes podría deducirse que la quinasa que más contribuye a la regulación de AtHAK5 es AtCIPK9, seguida de AtCIPK23 y AtCIPK1. Esto podría ser cierto y de hecho el gen *AtCIPK9* es el que se induce en mayor medida por ayuno de  $K^+$  de entre los genes que codifican estas tres quinasa (Figura 30). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mutación de un gen puede producir efectos compensatorios y alterar la función de otros sistemas relacionados con el proceso que se está estudiando. Es decir, no se puede descartar que, por ejemplo, la mutación *atcipk1* de lugar a un aumento de la actividad quinasa de AtCIPK9 o AtCIPK23 que compensen parcialmente la falta de AtCIPK1. Para profundizar en este aspecto sería necesario producir dobles y triples mutantes con estas quinasa. A todo esto, se une que, como se ha mencionado anteriormente, es posible que existan otras quinasa distintas de las estudiadas que también jueguen un papel en la regulación de AtHAK5.

Al analizar los datos de tamaño y concentraciones de  $K^+$  de las distintas líneas mutantes *atcipk1*, *atcipk9* y *atcipk23* se observan resultados interesantes. Estos datos corresponden a las muestras de las plantas tomadas al final del periodo de crecimiento durante 28 días en solución completa seguido de 12 días

en solución sin  $K^+$ . Se observa que las plantas *atcipk1* tienen un mayor tamaño que las WT (Figura 19 y Figura 20) mientras que las plantas *atcipk9* presentan un tamaño menor (Figura 26). El mayor tamaño de las plantas *atcipk1* no puede explicarse por una mayor concentración de  $K^+$  en su interior ya que la concentración de  $K^+$  tanto en la parte aérea como la raíz de estas plantas no es significativamente distinta de las de las plantas WT (Figura 21 y Figura 22). Esto indicaría que la quinasa AtCIPK1 podría estar implicada en otros procesos fisiológicos que cuando se alteran (ausencia de AtCIPK1 en la línea *atcipk1*) dan lugar a un mayor tamaño de la planta. Sin embargo, no hay que olvidar que, debido a su mayor tamaño, la cantidad total de  $K^+$  que han acumulado las plantas *atcipk1* durante el periodo de crecimiento es mayor que en las plantas WT. Por tanto, es posible que AtCIPK1 esté implicada en la regulación de algún otro sistema de transporte de  $K^+$  distinto de AtHAK5 que es importante para la acumulación de  $K^+$  durante el periodo de cultivo de las plantas. Hay que recordar que las plantas fueron cultivadas durante un largo periodo de tiempo (28 días) en solución completa y las concentraciones de  $K^+$  de estas plantas se derivan en gran medida de este periodo de cultivo. El posible papel de AtCIPK1 en la regulación de procesos fisiológicos distintos de la acumulación de  $K^+$  o de transportadores distintos de AtHAK5 resulta muy interesante y merecería ser investigado en el futuro. Por otra parte, el menor tamaño de las plantas *atcipk9*, en concreto de su parte aérea, tampoco se puede explicar por una menor concentración de  $K^+$ , ya que la concentración de  $K^+$  de raíz de esta línea no es significativamente distinta de la de las plantas WT y la de la parte aérea es significativamente superior a ésta (Figura 27). Al igual que en el caso de AtCIPK1, la quinasa AtCIPK9 podría estar implicada en otros procesos relacionados con el crecimiento de la planta o en la regulación de transportadores de  $K^+$  distintos de AtHAK5, que son importantes durante el periodo de cultivo de la planta. Es importante mencionar que la línea *atcipk9* muestra una mayor eficiencia en la translocación de  $K^+$  (Figura 29), lo que podría explicar la mayor concentración de  $K^+$  en la parte aérea en esta línea en comparación con las plantas WT. De nuevo, estas ideas resultan muy interesantes y necesitan ser investigadas en mayor profundidad.

## 4.2. CAPÍTULO 2: ESTUDIO DEL TRANSPORTADOR DE $K^+$ DE ALTA AFINIDAD DE TOMATE SLHAK5

Para caracterizar el transportador de  $K^+$  de tomate de alta afinidad SIHAK5 se utilizaron líneas mutantes nulas *slhak5* disponibles en el grupo de investigación y que se habían obtenido por edición génica basada en CRISPR-Cas. Se disponía de dos líneas independientes *slkak5-1*, *slhak5-2* y una tercera línea *slhak5-1* sin ADN-T, que había perdido el ADN-T al propagar la línea *slhak5-1*. La edición génica había dado lugar a mutaciones estables al principio del gen SIHAK5 que consistían en “indels” y que rompían la fase de lectura del gen, dando lugar a codones STOP prematuros.

### 4.2.1. Absorción de $K^+$ en el rango de la alta afinidad

Con el fin de caracterizar el mutante de tomate *slhak5-1* se llevaron a cabo experimentos para determinar en qué medida la mutación había afectado la absorción de  $K^+$  por la raíz. Al igual que en los experimentos anteriores, se utilizó  $Rb^+$  como elemento traza para su estudio.

Para ello se llevó a cabo un experimento a dos concentraciones distintas de  $Rb^+$  externo, 1 y 0,02 mM  $Rb^+$ , con plantas ayunadas de  $K^+$  y sin ayunar. Se crecieron plantas de la línea silvestre junto con plantas de la línea *slhak5-1* durante 14 días en cultivo hidropónico con solución control 1/5H que contenía 0,3 mM  $K^+$ . Tras este periodo, un lote de plantas se pasó a solución sin  $K^+$  mientras que el otro se mantuvo en la solución control con  $K^+$  durante 7 días más. Para el experimento de absorción de  $Rb^+$ , se pusieron los dos lotes de plantas, ayunadas y sin ayunar de  $K^+$ , en solución nutritiva que contenía las concentraciones de  $Rb^+$  indicadas anteriormente (1 y 0,02 mM de  $Rb^+$ ) durante 6 horas. Transcurrido este tiempo las plantas se cosecharon, tomando por separado las hojas, el tallo y las raíces de cada planta, se secaron y se determinó el contenido de iones de los distintos órganos.

En primer lugar, se observó que no existían diferencias significativas en el peso seco de los órganos de las plantas estudiadas, ni entre líneas ni entre tratamientos. Aunque no existían diferencias significativas, el peso seco de las



hojas de las plantas ayunadas de  $K^+$  fue algo menor que el de las plantas sin ayunar (Figura 32). El peso seco de las hojas osciló entre 0,06 g y 0,08 g, para la raíz y en el tallo fue alrededor de 0,01 g.

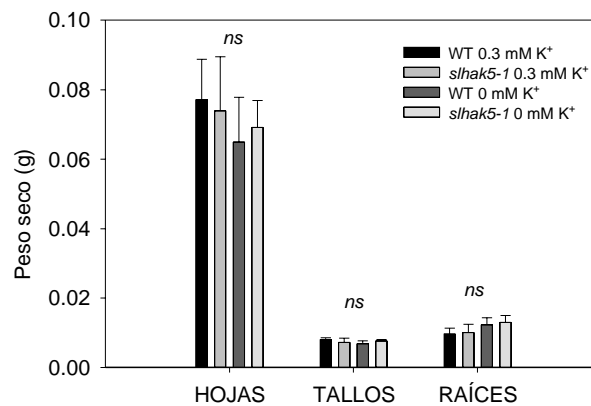


Figura 32. Peso seco de los distintos órganos. Las plantas WT y *slhak5-1* se crecieron durante 14 días en solución 1/5H con 0,3 mM  $K^+$ . Un lote de plantas se pasó a solución sin  $K^+$  durante 7 días y el otro se mantuvo en la solución con  $K^+$ . En la figura se muestra la media de tres repeticiones del peso seco de las hojas, tallos y raíces de las plantas. Las barras de error indican el error estándar. *ns* indica no significativo a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

En cuanto a la concentración de  $K^+$ , el ayuno de  $K^+$  redujo la concentración de este elemento con respecto al de las plantas sin ayunar, cerca de un 50%. Esta reducción fue estadísticamente significativa (Figura 33). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la concentración de  $K^+$  entre la línea mutante y el genotipo silvestre.

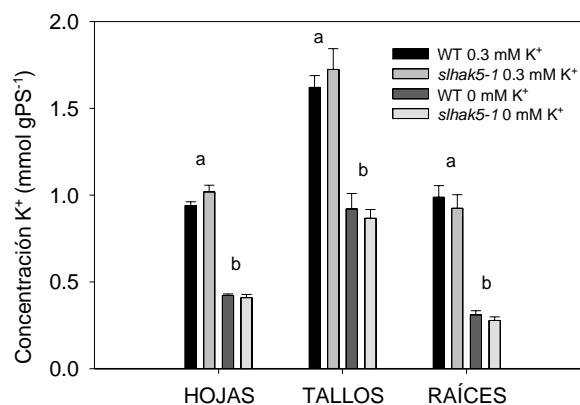


Figura 33. Concentración de K<sup>+</sup> en los distintos órganos de plantas ayunadas y sin ayunar de K<sup>+</sup>. Las plantas se cultivaron según lo indicado en la Figura 32. Tras la digestión del material vegetal, se determinó la concentración de K<sup>+</sup>. Los datos que se representan son la media de 5 repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

Se calculó la tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> en plantas sin ayunar de K<sup>+</sup> como está descrito en el apartado de Materiales y Métodos 3.2.3.2. Se pudo observar cómo en presencia de 1 mM de Rb<sup>+</sup> ambas líneas presentaban una tasa de absorción similar (Figura 34). En cambio, en presencia de 0,02 mM Rb<sup>+</sup> éstas presentaban valores de absorción muy inferiores a los de las plantas con 1 mM de Rb<sup>+</sup>, observándose diferencias significativas entre los genotipos y siendo la absorción de la línea *slhak5-1* significativamente inferior a la del genotipo silvestre.

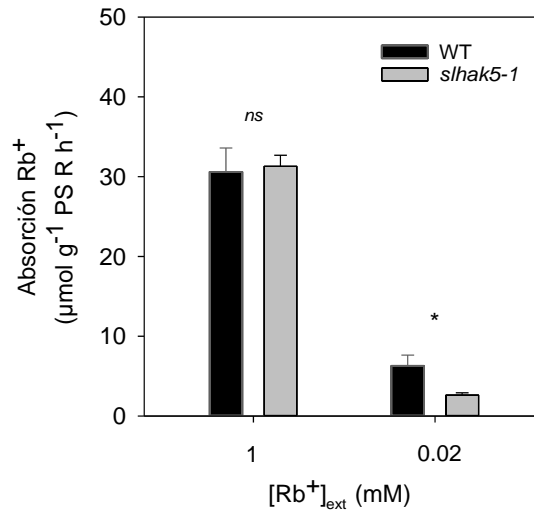


Figura 34. Tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> en plantas sin ayunar de K<sup>+</sup>. Las plantas se cultivaron según lo indicado en la Figura 32. Para el experimento, las plantas se incubaron 6 horas en solución nutritiva con Rb<sup>+</sup> a dos concentraciones, 1 mM y 0,02 mM. Tras la digestión del material vegetal se determinó el contenido de Rb<sup>+</sup>, a partir del cual se calcularon las tasas de absorción del mismo. Los datos que se representan son la media de 5 repeticiones. Las barras de error representan el error estándar y el \* indica diferencias significativas y *ns* no significativo a  $P < 0,05$  para el test t de Student.

El ayuno de K<sup>+</sup> aumentó la tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> con respecto a las plantas no ayunadas (Figura 35). Mientras que con 0,02 mM de Rb<sup>+</sup> en plantas no ayunadas los valores de absorción de Rb<sup>+</sup> del genotipo silvestre eran cercanos a 5 µmol g<sup>-1</sup> PS R h<sup>-1</sup>, en las plantas ayunadas la tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> se incrementó hasta valores cercanos a 20 µmol g<sup>-1</sup> PS R h<sup>-1</sup>. Esto demostró cómo la falta de K<sup>+</sup> durante 7 días producía un aumento considerable de la tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> en la planta silvestre. Sin embargo, la tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> era prácticamente nula en el mutante *slhak5-1*, con lo que se evidenció la necesidad del gen silvestre *SIHAK5* para la absorción de K<sup>+</sup> en el rango de concentraciones de la alta afinidad.

La tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> de las plantas ayunadas incubadas en presencia de 1 mM de Rb<sup>+</sup> en la solución de transporte no mostró diferencias significativas entre ambas líneas. En general se observó que la tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> se vio incrementada con respecto a la de las plantas sin ayunar de K<sup>+</sup> (Figura 35).

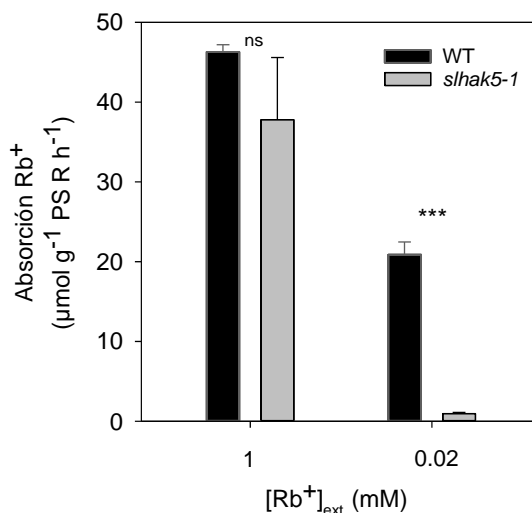


Figura 35. Tasa de absorción de  $\text{Rb}^+$  en plantas ayunadas de  $\text{K}^+$ . Las plantas se cultivaron y trataron según lo indicado en la Figura 34. Tras la digestión del material vegetal se determinó el contenido de  $\text{Rb}^+$  a partir del cual se calcularon las tasas de absorción del mismo. Los datos que se representan son la media de 5 repeticiones biológicas. Las barras de error representan el error estándar y \*\*\* indican diferencias significativas y *ns* no significativas a  $P < 0,001$  para el test t de Student.

Con el fin de comprobar que el fenotipo observado en la velocidad de absorción de  $\text{Rb}^+$  del mutante *slhak5-1* era debido a la mutación del gen SIHAK5 y no a otra característica de esa línea, se caracterizó otra línea independiente, *slhak5-2*, que portaba la misma mutación. Para ello, el experimento con plantas ayunadas de  $\text{K}^+$  y 0,02 mM de  $\text{Rb}^+$  en la solución de transporte se llevó a cabo también con la línea mutante *slhak5-2* (Figura 36). Los resultados obtenidos fueron similares a los de la línea *slhak5-1*. La tasa de absorción de  $\text{Rb}^+$  de la línea silvestre estuvo próxima a los  $20 \mu\text{mol g}^{-1} \text{PS R h}^{-1}$ , mientras que la absorción de  $\text{Rb}^+$  de la línea mutante resultó prácticamente nula.

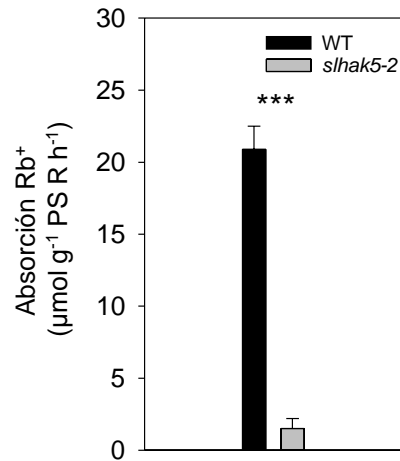


Figura 36. Tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> en plantas *slhak5-2* ayunadas de K<sup>+</sup>. Las plantas se cultivaron según lo indicado en la Figura 32. Para el experimento, las plantas se incubaron 6 horas en solución nutritiva con Rb<sup>+</sup> a una concentración de 0,02 mM. Tras la digestión del material vegetal se determinó el contenido de Rb<sup>+</sup> a partir del cual se calcularon las tasas de absorción del mismo. Los datos que se representan son la media de 5 repeticiones. Las barras de error representan el error estándar y \*\*\* indica diferencias significativas a  $P < 0,001$  para el test t de Student.

#### 4.2.2. Absorción y acumulación de Cs<sup>+</sup> en el rango de la alta afinidad

Se ha descrito que, en las plantas ayunadas de K<sup>+</sup>, el transportador *SIHAK5* puede ser el principal responsable de la entrada de Cs<sup>+</sup> al interior de la planta cuando el Cs<sup>+</sup> externo está presente a concentraciones bajas, en las que se observa un sistema de entrada de Cs<sup>+</sup> de alta afinidad (Rodenas et al., 2018). Con el objetivo de estudiar el efecto de la mutación *slhak5* en la entrada de Cs<sup>+</sup> en el rango de la alta afinidad, se llevó a cabo un experimento con plantas cultivadas 14 días en solución con 1,4 mM de K<sup>+</sup> y posteriormente ayunadas de K<sup>+</sup> 7 días. Tras estos 21 días, las plantas se incubaron durante 6 horas con solución sin K<sup>+</sup> a la que se añadió Cs<sup>+</sup> hasta alcanzar una concentración de 0,02 mM. El resultado de este experimento mostró claramente cómo la tasa de absorción de Cs<sup>+</sup> del mutante *slhak5-1* fue significativamente menor que la del genotipo silvestre (Figura 37).

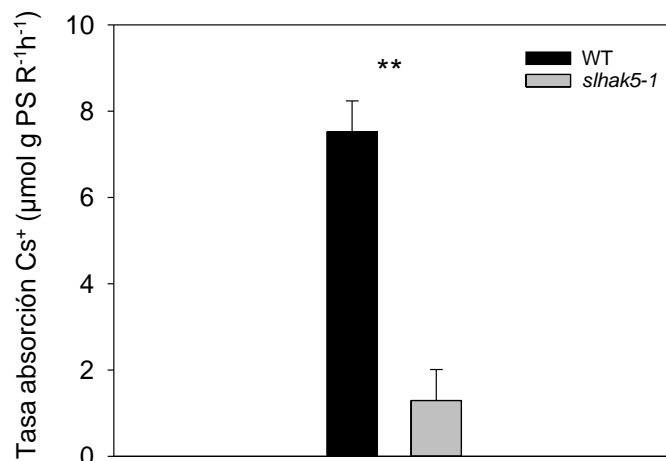


Figura 37. Tasa de absorción de Cs<sup>+</sup>. Las plantas WT y *slhak5-1* se crecieron y ayunaron como se explica en la Figura 32. Seguidamente, se incubaron durante 6 horas en una solución sin K<sup>+</sup> con 0,02 mM de CsCl. Tras la digestión del material vegetal se determinó la concentración de Cs<sup>+</sup> en el interior de las plantas a partir de la que se calculó la velocidad de absorción de Cs<sup>+</sup>. Los datos que se representan son la media de tres repeticiones, las barras de error representan el error estándar y \*\* indica diferencias significativas a P<0,01 para el test t de Student.

A continuación, se llevó a cabo un estudio más profundo para determinar cómo afectaba la presencia de Cs<sup>+</sup> al desarrollo de la planta y en qué medida se podrían ver afectados los frutos cuando el tomate se cultiva en suelos contaminados por Cs<sup>+</sup>, así como el efecto de la mutación *slhak5* sobre estos aspectos. Para ello se diseñó un experimento de acumulación de Cs<sup>+</sup>, en el cual, las plantas de la línea silvestre y del mutante *slkak5-1* se crecieron en cultivo hidropónico con una concentración constante de K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> de 0,3 mM y 0,02 mM respectivamente. Las plantas se mantuvieron en esta solución durante 90 días, llegando hasta fructificación, y se cosecharon los distintos órganos, raíz, tallo, hoja y frutos y, diferenciando entre hoja joven y hoja madura, para determinar los contenidos de Cs<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

Se observó cómo para todos los órganos, la concentración de Cs<sup>+</sup> era muy inferior en el mutante con respecto al genotipo silvestre (Figura 38 A). El órgano que más Cs<sup>+</sup> acumuló fue la raíz que, en el caso del genotipo silvestre, mostró una concentración de aproximadamente 0,2 mmol g<sup>-1</sup> PS, mientras que en el mutante

este valor fue próximo a 0. En cuanto a la concentración de  $K^+$ , no se observaron diferencias significativas entre las líneas en ninguno de los órganos estudiados excepto en el fruto, donde la concentración de  $K^+$  resultó ser mayor en el genotipo silvestre que en el mutante (Figura 38 B).

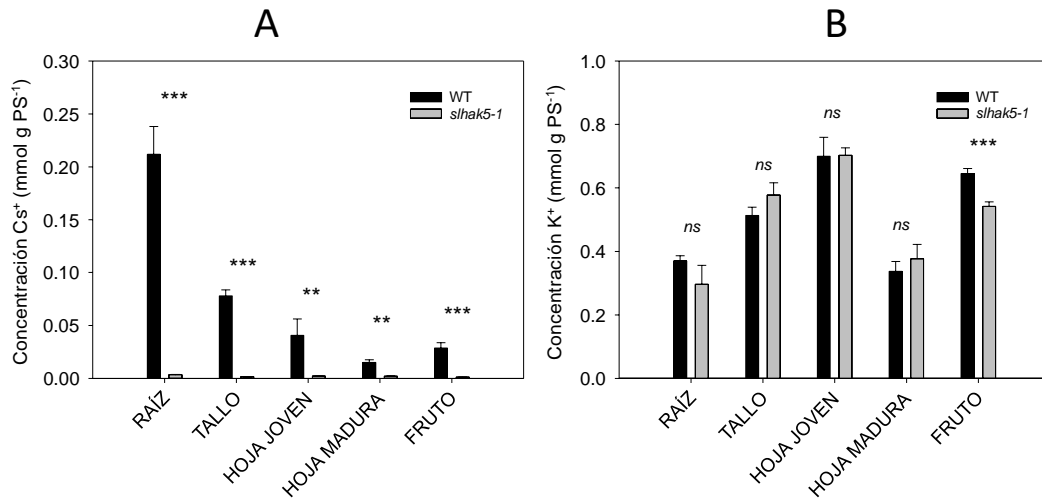


Figura 38. Concentración de  $Cs^+$  (A) y de  $K^+$  (B) en plantas crecidas con 0,3 mM  $K^+$  y 0,02 mM  $Cs^+$ . Las plantas se cultivaron durante 90 días en solución con 0,3 mM  $K^+$  y 0,02 mM  $Cs^+$  hasta fructificación. Se cosechó el material vegetal y se determinó la concentración de  $Cs^+$  y  $K^+$  en los distintos órganos. Los datos representan la media de tres repeticiones y las barras de error son el error estándar. \*\* y \*\*\* indican diferencias significativas a  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente y *ns* no significativas, para el test t de Student.

Para determinar el grado de discriminación entre  $Cs^+$  y  $K^+$  de las líneas, se calculó la relación de concentración de  $K^+$  y  $Cs^+$  ( $K^+/Cs^+$ ) en los distintos órganos estudiados (Figura 39). Se observó que, en todos los casos, esta relación era mayor en la línea mutada en el gen *SIHAK5*, mostrando esta línea una mayor discriminación del  $Cs^+$  frente al  $K^+$  bajo estas condiciones de cultivo.

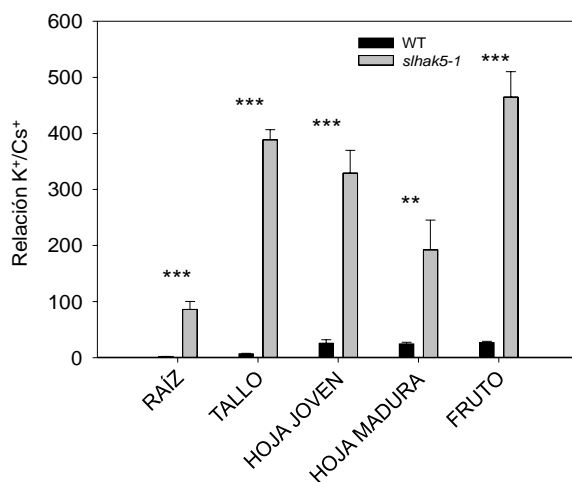


Figura 39. Relación  $K^+/Cs^+$  en plantas crecidas con 0,3 mM  $K^+$  y 0,02 mM  $Cs^+$ . El cálculo de la relación  $K^+/Cs^+$  de estas plantas se llevó a cabo con los datos representados en la Figura 40 (A y B). Los datos que se representan son la media de tres repeticiones, las barras de error representan el error estándar. \*\* y \*\*\* indican diferencias significativas a  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente, para el test t de Student.

#### 4.2.3. Absorción de $K^+$ en el rango de la alta afinidad en condiciones de salinidad

Para evaluar la importancia del transportador SIHAK5 en la absorción de  $K^+$  bajo condiciones limitantes de este elemento y en presencia de  $Na^+$ , se diseñó un experimento de crecimiento en el que, plantas del genotipo silvestre y del mutante *slhak5-1* se crecieron en cultivo hidropónico durante 7 días en condiciones control (1,4 mM  $K^+$ ). Posteriormente, un bloque de plantas se cultivó durante 14 días en una solución que contenía 10  $\mu$ M de  $K^+$ . Un segundo bloque de plantas se transfirió a una solución con 10  $\mu$ M de  $K^+$  a la que se añadió NaCl hasta llegar a una concentración de 50 mM de forma que la ratio  $Na^+:K^+$  era 5000:1. Tras estos tratamientos se realizó un experimento de absorción de  $Rb^+$  en el que las plantas se incubaron 6 horas con solución sin  $K^+$  y una concentración de 0,02 mM de  $Rb^+$ . Se cosechó el material vegetal y secó en la estufa para determinar el contenido interno de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Rb^+$ .



Teniendo en cuenta los pesos secos de las plantas, se observó que las plantas del mutante *slhak5-1* resultaron de menor tamaño que las del genotipo silvestre en ambos tratamientos (Figura 41 A).

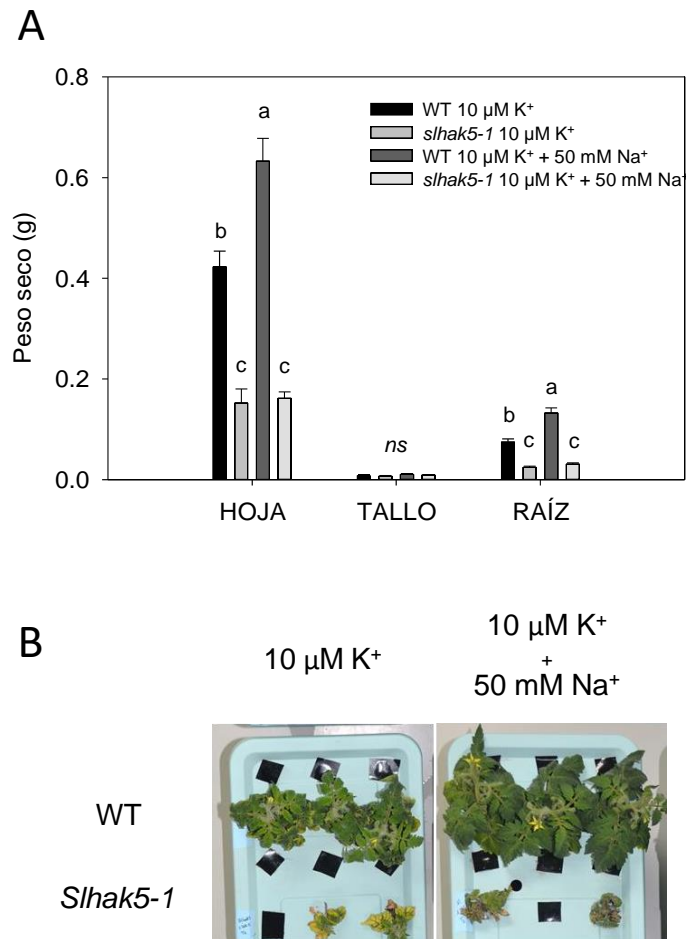


Figura 41. Peso seco (A) y fotografías (B) de las plantas WT y *slhak5-1* crecidas con 10 μM de K<sup>+</sup>, con y sin 50 mM NaCl. Las plantas del genotipo silvestre y *slhak5-1* se crecieron durante 7 días en solución 1/5H (1,4 mM K<sup>+</sup>) y seguidamente un lote se pasó a solución 1/5H con 10 μM K<sup>+</sup> y 50 mM NaCl y otro lote a 1/5H con 10 μM K<sup>+</sup> sin NaCl, durante 14 días. (A) Los valores que se representan son la media de 4-6 plantas y las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  para el test de Tukey. *ns* indica que no existen diferencias significativas. (B) Fotografías de las plantas tomadas al final del experimento.

Se observó una reducción del peso seco de la planta del genotipo mutante, respecto al silvestre, algo superior al 50%, en el caso del tratamiento sin NaCl, y del 70%, en el caso del tratamiento con NaCl. Comparando los pesos de la línea mutante cultivada con y sin 50 mM de NaCl en el medio, no se observaron diferencias significativas de los pesos de hoja, raíz y tallo entre los tratamientos. Resultó significativo el mayor tamaño de las plantas silvestre que crecieron en presencia de 50 mM de NaCl, con respecto a las que lo hicieron sin NaCl. Se podría decir que en las plantas silvestres cultivadas en condiciones de  $K^+$  limitante (10  $\mu$ M), la presencia de una concentración moderada de NaCl (50 mM) tenía un efecto beneficioso. Sin embargo, mientras que el aumento del peso seco debido a la salinidad fue de un 53% para el genotipo silvestre, en el mutante no se observó dicho aumento. Esto puso de manifiesto la importancia del transportador SHAK5 para que la planta pudiera beneficiarse del efecto positivo del  $Na^+$  en condiciones de bajo  $K^+$  en el medio.

Cabe destacar los síntomas de clorosis que se observaron debido al déficit de  $K^+$ , afectando principalmente al genotipo mutante (Figura 40 B).

Tras la determinación de la concentración de  $K^+$  en raíz, hoja y tallo de ambas líneas, se observó que en ausencia de 50 mM de NaCl, la concentración de  $K^+$  de línea *shak5-1* era aproximadamente un 50% menor, en hoja, tallo y raíz que en el genotipo silvestre (Figura 42).

En presencia de 50 mM de NaCl, las concentraciones internas de  $K^+$  se redujeron en ambas líneas, siendo la concentración de este elemento en hoja un 50% menor en el genotipo mutante que en el silvestre. Únicamente, se observaron diferencias significativas entre las líneas en hoja, no siendo así en el tallo ni en la raíz. Por lo tanto, las mayores diferencias observadas entre la línea mutante y el genotipo silvestre tuvieron lugar en el tratamiento con bajo  $K^+$  y en ausencia de NaCl.

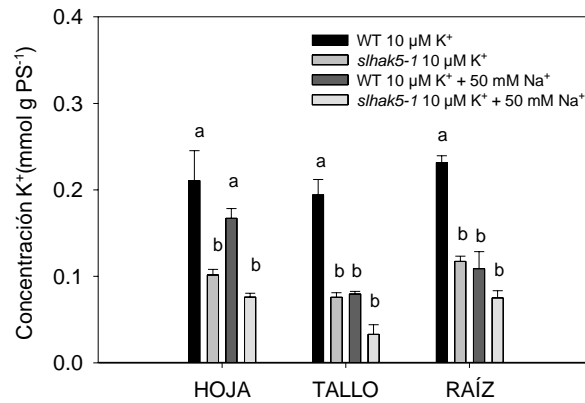


Figura 42. Concentración de K<sup>+</sup> de las plantas WT y *slhak5-1* crecidas en 10  $\mu$ M de K<sup>+</sup> con y sin 50 mM NaCl. Las plantas se cultivaron según lo indicado en la Figura 40. Se calculó la concentración de K<sup>+</sup> en cada uno de los órganos y las condiciones estudiadas. Los valores que se representan son la media de 4-6 plantas y las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  para el test de Tukey.

La concentración de Na<sup>+</sup> en los órganos de las distintas plantas se determinó para ambos tratamientos (Figura 43 A). Se observó cómo en el tratamiento sin Na<sup>+</sup> no aparecieron diferencias significativas entre las líneas en la concentración de Na<sup>+</sup> en ninguno de los órganos estudiados. En el caso del tratamiento con 50 mM Na<sup>+</sup> se observaron diferencias en la concentración de Na<sup>+</sup> en el tallo mostrando el genotipo silvestre una concentración de Na<sup>+</sup> aproximadamente dos veces superior que el mutante *slhak5-1*. No se observaron diferencias entre ambos genotipos en la concentración de Na<sup>+</sup> de los demás órganos.

En cuanto a la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (Figura 43 B), tanto en hoja como en raíz, este valor fue superior en el genotipo silvestre que en el mutante, con valores aproximados de 0,08 y 0,04, en hoja respectivamente y 0,07 y 0,05 en raíz, respectivamente.

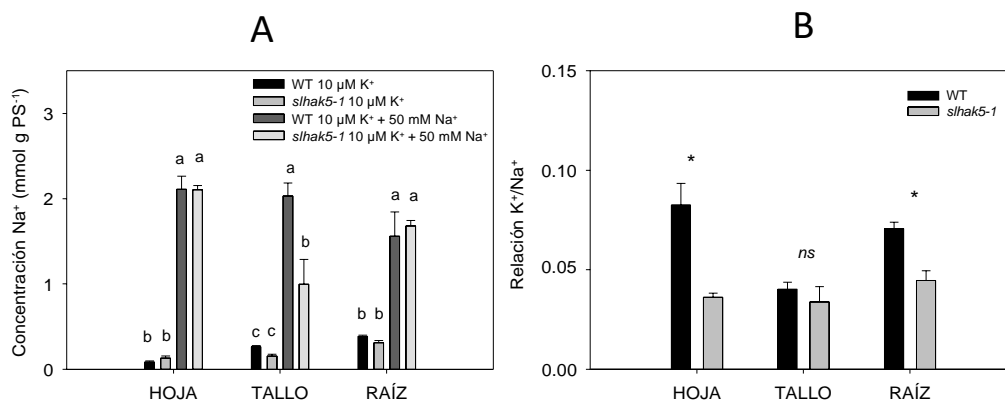


Figura 43. Concentración de Na<sup>+</sup> de las plantas WT y *slhak5-1* crecidas en 10  $\mu$ M de K<sup>+</sup> con y sin 50 mM NaCl (A) y relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (B). Las plantas se cultivaron según lo indicado en la Figura 40. Se calculó la concentración de Na<sup>+</sup> en cada uno de los órganos. La relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> se calculó utilizando los datos de plantas tratadas con 50 mM de NaCl. Los valores que se representan son la media de 4-6 plantas y las barras el error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  para el test de Tukey. *ns* indica que no existen diferencias significativas.

Con las mismas plantas de ambos tratamientos, se llevó cabo un experimento de absorción de Rb<sup>+</sup> en el rango de alta afinidad con 0,02 mM de Rb<sup>+</sup> en la solución nutritiva (Figura 43).

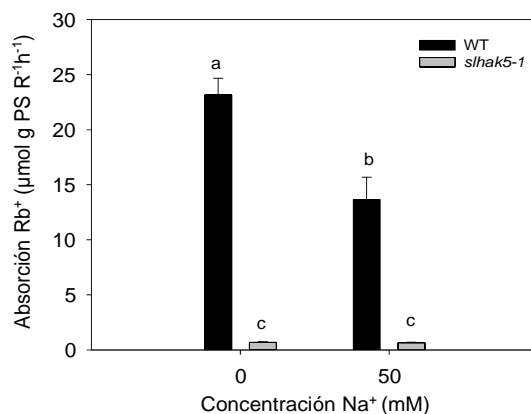


Figura 44. Tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> en plantas WT y *slhak5-1* crecidas con 10  $\mu$ M de K<sup>+</sup> con y sin 50 mM NaCl. Las plantas se cultivaron según lo indicado en la Figura 40. Se calculó la tasa de absorción de Rb<sup>+</sup> de cada una de las líneas estudiadas en presencia o ausencia de 50 mM de NaCl. Los valores que se representan son la media de 4-6 plantas y las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  para el test de Tukey.

Las plantas del genotipo silvestre en ausencia de  $\text{Na}^+$  mostraron una tasa de absorción de  $\text{Rb}^+$  de aproximadamente  $23 \mu\text{mol Rb}^+ \text{g}^{-1}\text{PS raíz h}^{-1}$ , mientras que en las plantas tratadas con 50 mM de NaCl, la absorción se redujo casi un 50% con respecto a las plantas sin NaCl. La absorción de  $\text{Rb}^+$  de la línea *slhak5-1* fue próxima a 0 en las plantas de ambos tratamientos, con y sin NaCl.

#### 4.2.4. Despolarización de la membrana plasmática de las células de la raíz en respuesta a cambios en la concentración de $\text{K}^+$ del medio externo

Debido al bajo número de semillas producido por las plantas mutantes *slhak5* (Figura 47 C), no se pudo llevar a cabo una caracterización cinética completa del efecto de la mutación sobre la absorción de  $\text{K}^+$  de alta afinidad mediante experimentos de acumulación de  $\text{Rb}^+$ . Por ello, se utilizó la despolarización de la membrana plasmática de las células epidérmicas y del córtex de la raíz producida por el aumento de la concentración externa de  $\text{K}^+$  como un enfoque alternativo. La despolarización de la membrana plasmática cuando se incrementa el  $\text{K}^+$  externo se puede relacionar directamente con la entrada de  $\text{K}^+$  (Spalding et al., 1999). Mediante esta aproximación se pueden obtener abundantes datos con un número limitado de raíces. Mediante la utilización de microelectrodos insertados en las células epidérmicas y corticales de la raíz de plantas WT y *slhak5-1*, crecidas en ausencia de  $\text{K}^+$ , se determinó el potencial de membrana de las mismas, así como su respuesta a cambios de  $\text{K}^+$  externo. Se observó que el aumento de  $\text{K}^+$  externo producía despolarizaciones de membrana mucho mayores en las raíces de las plantas WT que en las del mutante, excepto a  $500 \mu\text{M K}^+$ , concentración en la que se observaban despolarizaciones similares en ambas líneas (Figura 45). Las despolarizaciones del potencial de membrana se representaron frente a las concentraciones externas de  $\text{K}^+$  y se ajustaron los datos a ecuaciones de Michaelis-Menten. Se calcularon los parámetros cinéticos y se observó que la despolarización de membrana de las plantas del genotipo silvestre mostraba la existencia de un componente de absorción de  $\text{K}^+$  con una  $K_m$  aparente de  $26,4 \pm 5,2 \mu\text{M K}^+$ , mientras que la línea *slhak5-1* presentaba un componente con una  $K_m$  de  $755 \pm 15,9 \mu\text{M}$ .

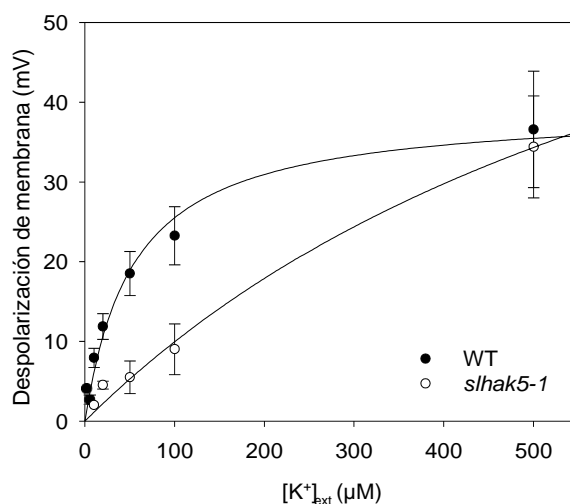


Figura 45. Despolarización de membrana plasmática de células de raíz inducida por  $K^+$  en plantas WT y *slhak5-1*. Mediante la inserción de microelectrodos en las células epidérmicas y corticales de la raíz de plántulas WT y *slhak-5* cultivadas en agua destilada durante 10 días se registraron sus potenciales de membrana con un electrómetro. Las raíces se perfundieron con una solución que contenía 0,5 mM  $CaCl_2$  tamponada a pH 6 (10 mM MES / Bis-Tris) y diferentes cantidades de KCl para alcanzar las concentraciones indicadas en la figura. Las despolarizaciones de la membrana plasmática inducidas por el  $K^+$  externo, se representaron frente a la concentración de  $K^+$  externa. Los datos se ajustaron a una cinética de Michaelis-Menten (los valores de  $R^2$  de los ajustes fueron 0,96 y 0,99 para los datos de WT y *slhak5-1* respectivamente). Se muestran valores promedio de al menos tres repeticiones y las barras de error indican el error estándar.

#### 4.2.5. Producción de frutos y semillas

Una de las características que se observó en la línea mutante *slhak5-1* fue un marcado fenotipo de baja producción de frutos (Figura 46), de menor tamaño y con un número menor de semillas que el genotipo silvestre. Esta característica nos llevó a pensar que el gen mutado podría estar desempeñando alguna función en la formación del fruto y las semillas. Para estudiar esta posibilidad, se llevó a cabo un experimento en el que plantas de ambas líneas se crecieron en cultivo hidropónico bajo condiciones control 1/5H (1,4 mM  $K^+$ ). Cuando las plantas fructificaron, se procedió a realizar cinco cosechas de fruto, contando y pesando los frutos, y cuantificando el número de semillas de cada uno de los tomates

cosechados. En el momento de la primera cosecha, se evidenció un retraso en la maduración de los tomates de la línea mutante respecto a la silvestre, y no fue posible cosechar frutos de la línea mutante en la primera de las cosechas realizadas. El bajo número de tomates cosechados de la línea mutante en la segunda cosecha también fue debido al retraso de entrada en producción de la línea mutante. En cambio, en las tres cosechas posteriores, no se observaron diferencias significativas en el número de tomates cosechados para cada una de las líneas.

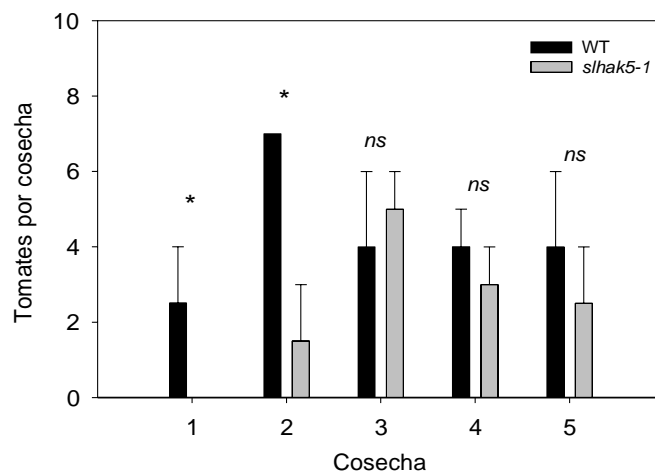


Figura 46. Número de frutos por cosecha de las líneas WT y *slhak5-1*. Las plantas se crecieron durante 90 días en solución control (1,4 mM K<sup>+</sup>) hasta fructificación. La cosecha de los tomates se realizó cuando el fruto se encontraba maduro. \* indica diferencias significativas y *ns* no significativas a  $P < 0,05$  para el test t de Student.

Como se ha dicho anteriormente, el tamaño del fruto y el número de semillas por fruto también se vieron afectados en la línea mutante. El tamaño medio de los frutos de la línea silvestre fue significativamente mayor que el de la línea mutante, un 30 % superior, al igual que el número medio de semillas por fruto. Mientras que los frutos de la línea silvestre contenían aproximadamente 15 semillas por fruto, los frutos de la línea *slhak5-1* contenían una o ninguna semilla (Figura 46 A, B y C).

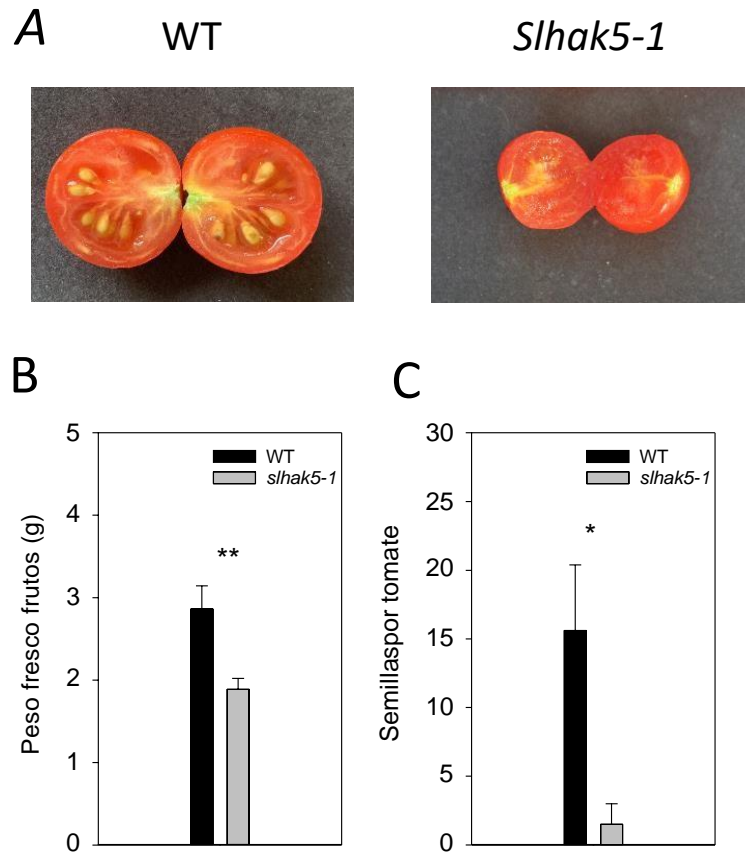


Figura 47. Fotografía de los frutos (A), promedio de peso fresco (B) y número medio de semillas (C) por fruto de plantas WT y *slhak5-1*. Las plantas se cultivaron según se detalla en la Figura 46. Para cada uno de los frutos cosechados se determinó el peso fresco y el número de semillas de su interior. \* y \*\* indican diferencias significativas a  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$  respectivamente para el test t de Student.

#### 4.2.6. Expresión de *SIHAK5* en distintos órganos de la planta

Tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, el fenotipo de baja producción de frutos y el escaso número de semillas por fruto, nos llevó a pensar que el gen *SIHAK5* podía estar implicado en algún proceso fisiológico en los órganos reproductores. Esto implicaría que el gen *SIHAK5* se tendría que expresar en dichos órganos. Para conocer la expresión de este gen en los órganos reproductores, se crecieron plantas de la línea silvestre en condiciones control 1/5H (1,4 mM  $K^+$ ) y se llevaron hasta floración. Posteriormente, se cosechó



material vegetal de raíz, tallo, tallo floral, hojas y flores. Las flores se diseccionaron y muestrearon separando los sépalos, pétalos, estambres y pistilos. Tras la extracción de ARN y posterior síntesis de ADNc se determinó la expresión de *SIHAK5* por qPCR.

Los resultados (Figura 48) mostraron cómo el gen *SIHAK5* se expresaba principalmente en la raíz, seguido de los estambres y pistilos, siendo su expresión ligeramente menor en las hojas y los tallos.

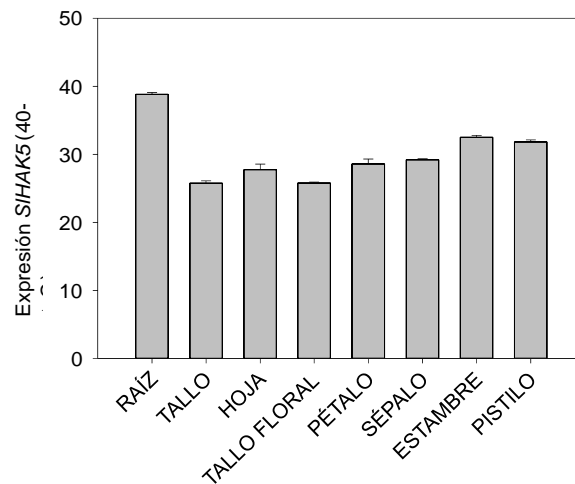


Figura 48. Nivel de expresión de *SIHAK5* en diferentes órganos de la planta silvestre. Se crecieron las plantas WT en solución 1/5H (1,4 mM K<sup>+</sup>) hasta floración. Las plantas se separaron en los órganos que se indican y se llevó a cabo la extracción de ARN y posterior síntesis de ADNc. Se utilizó la PCR en tiempo real para determinar el nivel de expresión relativo del gen *SIHAK5* con respecto al gen endógeno *SIEF1α*. El nivel de expresión se calculó como  $40-\Delta Ct$ , ( $\Delta Ct = Ct_{SIHAK5} - Ct_{SIEF1\alpha}$ ). Los valores que se representan corresponden con la media de 3 repeticiones y las barras de error con el error estándar.

#### 4.2.7. Caracterización del polen

En el proceso de fertilización del óvulo y del correcto desarrollo de la semilla, la germinación del polen y la elongación del tubo polínico son determinantes (Wilhelmi and Preuss, 1999). Los resultados obtenidos anteriormente, en los que se observaba una baja producción de semillas en el mutante *slhak5-1*, junto con la observación de que el gen *SIHAK5* se expresaba en

los estambres de la flor, sugerían que el transportador SIHAK5 podría estar cumpliendo alguna función en la fisiología del polen. Para estudiar esta posibilidad se realizaron ensayos de germinación de polen en medio de germinación, al cual se le añadieron distintas concentraciones de  $K^+$  para evaluar el efecto de este elemento en la germinación del mismo. Se utilizaron tres concentraciones distintas, 0, 1 y 5 mM  $K^+$ . Las muestras de polen se espolvorearon sobre portaobjetos con medio de germinación y se incubaron 4 horas en la misma cámara de cultivo en la que se cultivaban las plantas.

Se observó que, mientras que los granos de polen del genotipo silvestre habían germinado en un porcentaje elevado y presentaban una forma redondeada y turgente (Figura 49 A), el polen de la línea mutante prácticamente no había germinado y presentaba un aspecto típico de “grano de café”, lo cual indicaba una falta de turgencia debida a la falta de hidratación del grano de polen (Figura 49 B). Tras la cuantificación de los granos de polen germinados, se observó que la tasa de germinación para el genotipo silvestre era próxima al 50%, mientras que para la línea *slhak5-1* no llegaba al 10%. Además, el aumento de la concentración de  $K^+$  del medio, no tuvo efecto en el porcentaje de germinación de la línea silvestre, mientras que en el mutante parecía disminuirla (Figura 49 B).

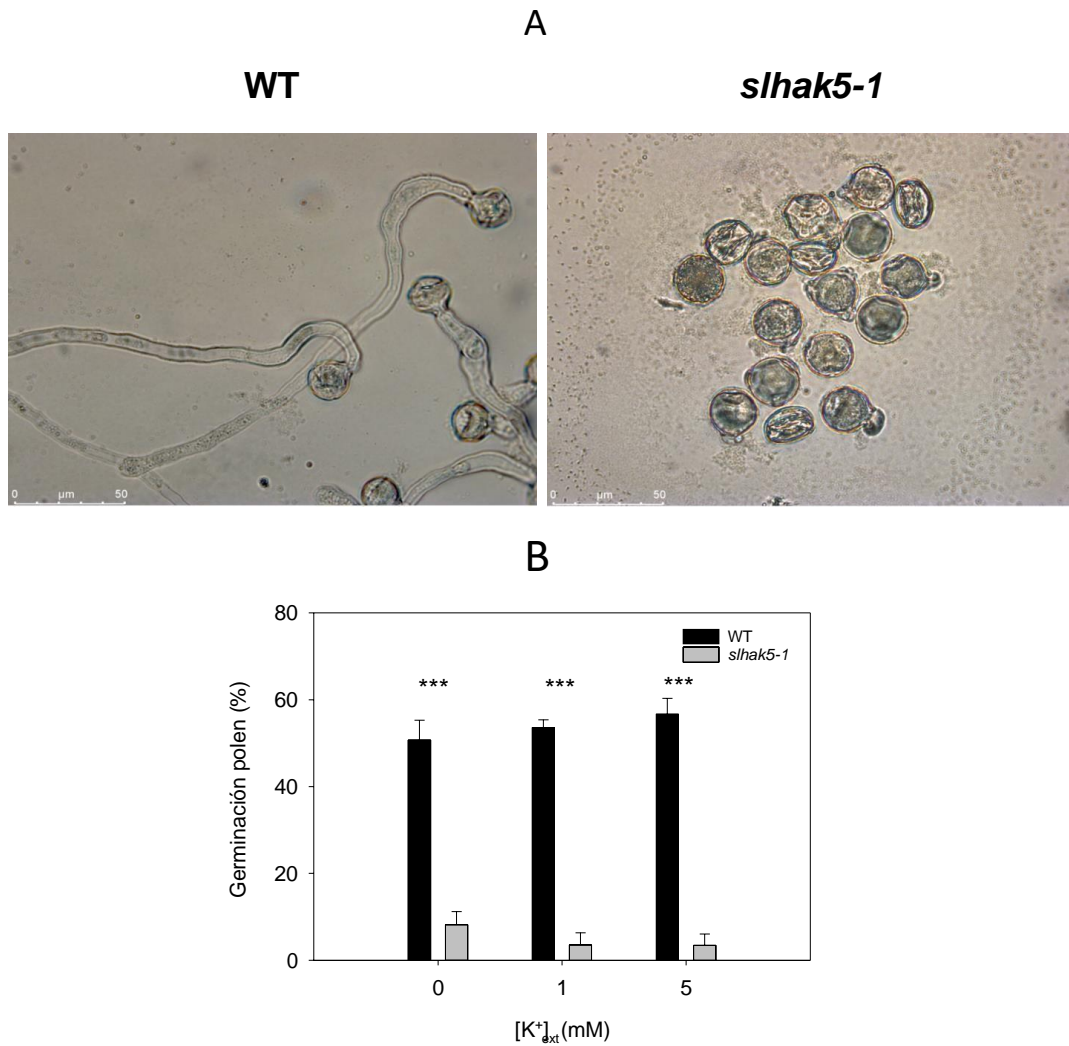


Figura 49. Imágenes de polen de WT (A) y *slhak5-1* (B) y porcentajes de germinación del polen (C). El polen de las líneas WT y *slhak5-1* se espolvoreó sobre medio de germinación con distintas concentraciones de K<sup>+</sup> (0, 1 y 5 mM KCl). Se incubó durante 4 horas y se determinó el porcentaje de granos germinados. Los datos que se representan corresponden a la media de al menos 200 granos de polen de cada línea. \*\*\* indica diferencias significativas a  $P < 0,001$  para el test t de Student.

Tras la cuantificación del porcentaje de germinación, se llevó a cabo la determinación de la longitud del tubo polínico de los granos germinados tras 4 horas de incubación (Figura 50), considerándolos como tal cuando la longitud del

tubo polínico resultaba ser al menos igual que el diámetro del grano de polen. Se observó que la longitud de los tubos polínicos del genotipo silvestre era significativamente mayor que la del mutante. La adición de  $K^+$  al medio de germinación aumentó la longitud del tubo polínico en el polen silvestre, mientras que en el mutante el efecto fue al contrario.

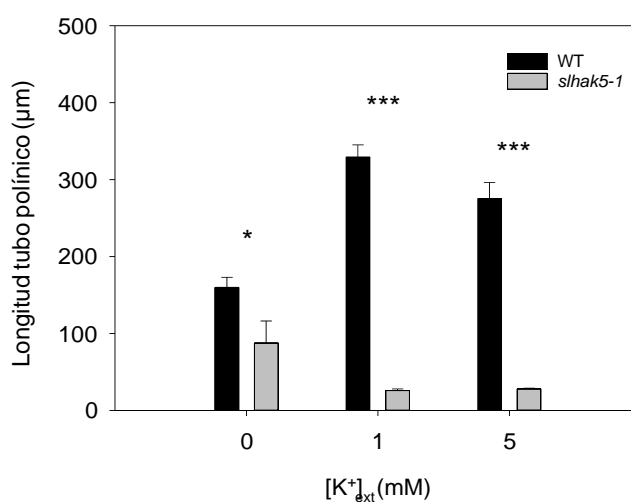


Figura 50. Longitud del tubo polínico ( $\mu\text{m}$ ). El polen de las líneas WT y *slhak5-1* se germinó como se detalla en la Figura 49. Se llevó a cabo la determinación de la longitud del tubo polínico de los granos germinados. Los datos que se representan corresponden a la media de al menos 200 granos de polen de cada línea. \* y \*\*\* indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  y  $P < 0,001$  respectivamente para el test t de Student.

Con el fin de comprobar si el fenotipo observado en los granos de polen era debido a la mutación que se había realizado en el gen *SIHAK5*, se llevaron a cabo los mismos experimentos que con la línea *slhak5-1*, en la línea *slhak5-2* y en una línea descendiente de la *slhak5-1*, que había perdido el ADN-T, determinándose los porcentajes de germinación y la longitud del tubo polínico en ambas líneas. Los resultados obtenidos de los ensayos con estas dos líneas fueron similares a los obtenidos en los experimentos con la línea *slhak5-1* (Figura 51 A y B).

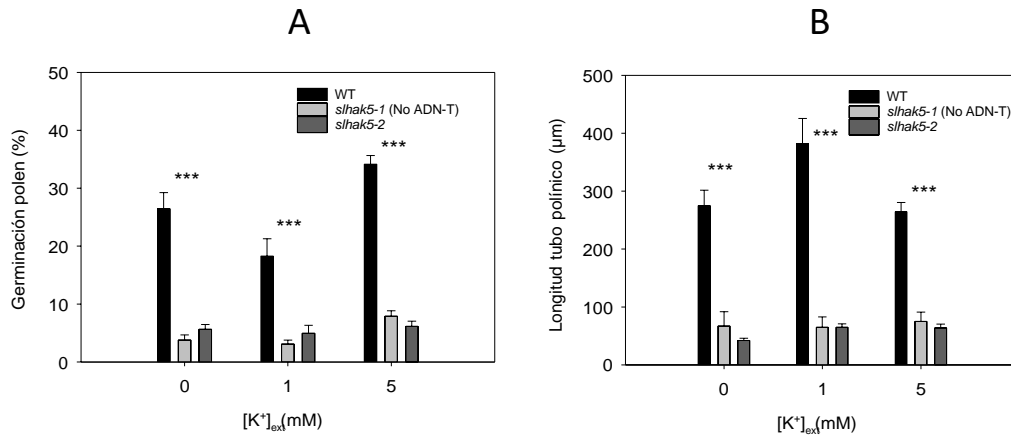


Figura 51. Porcentajes de germinación (A) y longitud del tubo polínico ( $\mu\text{m}$ ) (B) en las líneas *slhak5-1* sin ADN-T y *slhak5-2*. El polen de las líneas WT, *slhak5-1* sin ADN-T y *slhak5-2* se germinó como se detalla en la Figura 49. Se llevó a cabo la cuantificación de los granos de polen germinados y la determinación de la longitud del tubo polínico de los granos germinados. Los datos que se representan corresponden con la media de al menos 200 granos de polen de cada línea. \*\*\* indica diferencias significativas a  $P < 0,001$  para el test t de Student.

Los fenotipos observados podían deberse a que el polen de las plantas silvestres y las mutantes tuviera distintas concentraciones de  $K^+$  interno, lo que podía dar lugar a la diferente germinación del polen y elongación del tubo polínico. Para estimar las concentraciones relativas de  $K^+$  en el interior del grano de polen, se utilizó el tinte fluorescente sensible a  $K^+$  "Ion Potassium Green 4" (IPG-4), el cual es permeable a la membrana celular. Para calibrar el equipo y ajustar los parámetros de adquisición de las imágenes con el fin de eliminar la fluorescencia de fondo, se utilizó una muestra de polen silvestre sin tinte. A continuación, se midió la fluorescencia del IPG-4 en las distintas muestras de polen que se habían incubado con IPG4 (Figura 52 A). Se observó que los granos de polen del genotipo silvestre incubados en medio sin  $K^+$ , presentaban un mayor nivel de fluorescencia respecto a los de la línea *slhak5-1*. Cuando se germinaba el polen en medio con 1 mM de  $K^+$ , se observó una mayor fluorescencia en el interior de los granos de polen del genotipo silvestre, sugiriendo que este polen era capaz de absorber  $K^+$  del medio. Sin embargo, este aumento de fluorescencia no tenía lugar en el polen de la línea mutante (Figura 52 B).

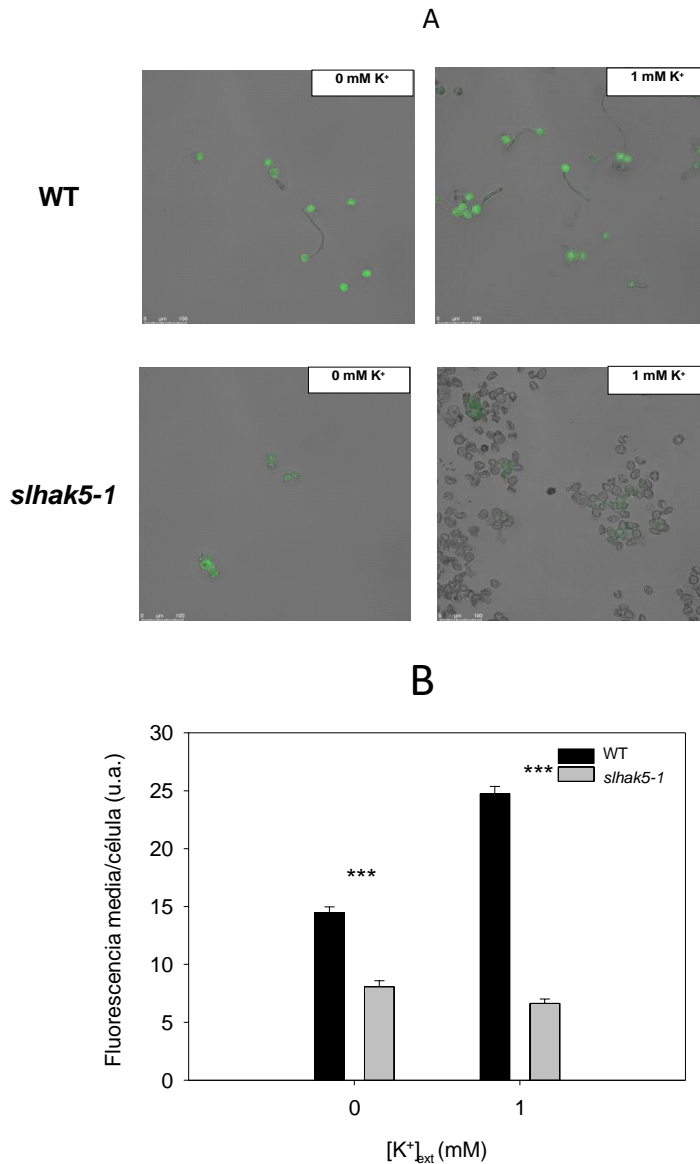


Figura 52. Imágenes de los granos de polen y de la fluorescencia debida a IPG-4 en polen de plantas WT y *slhak5-1* (A), y cuantificación de la fluorescencia (B). El polen de las líneas WT y *slhak5-1* se germinó en medio de germinación con distintas concentraciones de K<sup>+</sup> (0 y 1 mM KCl) y 20 μM de tinte IPG-4. Se incubó durante 10 horas y se observaron en un microscopio de epifluorescencia para determinar la fluorescencia debida al IPG-4 en el interior del polen. Los datos que se representan corresponden con la media de al menos 200 granos de polen de cada línea. \*\*\* indican diferencias significativas a  $P < 0,001$  para el test t de Student.

También se realizaron los mismos experimentos de estimación del  $K^+$  interno del polen mediante la fluorescencia de IPG-4 con las líneas *slhak5-2* y *slhak5-1* (sin ADN-T), obteniéndose similares resultados. El polen de estas dos líneas presentaba una menor fluorescencia de IPG-4 que el de la línea WT, sugiriendo una menor concentración de  $K^+$  en los granos de polen de las líneas mutantes (Figura 53).

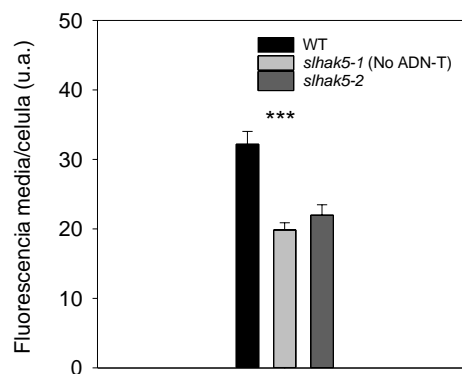


Figura 53. Cuantificación de la fluorescencia debida a IPG-4 en el polen de las líneas WT, *slhak5-1* sin ADN-T y *slhak5-2*. El polen de las líneas WT y *slhak5-1* sin ADN-T y *slhak5-2* se germinó como se detalla en la Figura 52 y se determinó la fluorescencia debida a IPG-4 de los granos de polen. Los datos que se representan corresponden con la media de al menos 200 granos de polen de cada línea. \*\*\* indica diferencias significativas a  $P < 0,001$  para el test t de Student.

#### 4.2.8. Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo, empleando los mutantes de pérdida de función *slhak5* obtenido mediante CRISPR-Cas, demuestran que el transportador SIHAK5 es el principal responsable de la absorción de  $K^+$  en el rango de la alta afinidad en las plantas de tomate. Esta información se obtuvo del estudio de dichas líneas mediante tres abordajes distintos: experimentos de absorción de  $Rb^+$  (Figura 34 y Figura 35), despolarización de la membrana plasmática de las células de la raíz inducida por la presencia de  $K^+$  (Figura 45) y experimentos de crecimiento bajo concentraciones constantes de  $K^+$  (Figura 42).

Estos tres enfoques han permitido el establecimiento de un rango de concentraciones externas de  $K^+$  y condiciones de crecimiento de las plantas donde SIHAK5 es el principal sistema de absorción de  $K^+$  en la raíz. En plantas sometidas a ayuno de  $K^+$ , SIHAK5 es el principal responsable de la absorción de  $K^+$  a concentraciones externas de  $K^+$  inferiores a 0,3 mM (Figura 35, Figura 36 y 43). En base a este resultado, cabe destacar el impacto que produjo la mutación *slhak5* sobre el crecimiento a largo plazo de las plantas *slhak5-1* cultivadas con 10  $\mu$ M de  $K^+$ , las cuales mostraron claros síntomas de clorosis debidos a la deficiencia de  $K^+$  (Figura 40 B), una reducción del peso de sus órganos muy significativa (Figura 40 A), y una disminución de aproximadamente el 50% en la concentración de  $K^+$  de los órganos estudiados respecto al genotipo silvestre (Figura 42). Cuando las plantas de la línea *slhak5-1* se cultivaban en condiciones control, con suficiente  $K^+$ , y posteriormente se ayunaban de  $K^+$  durante 7 días, no se observaba dicho fenotipo (Figura 33), seguramente debido a las reservas de  $K^+$  almacenadas por la planta durante el tiempo que se cultivaron en condiciones de suficiencia de  $K^+$ . Por lo tanto, la contribución de SIHAK5 a la nutrición de  $K^+$  en plantas con deficiencia en este elemento depende del tiempo en que la planta se encuentre en estas condiciones, y de la edad de la planta, siendo las plantas jóvenes más sensibles al estrés por deficiencia de  $K^+$  que las plantas adultas.

Comparando los resultados de esta Tesis Doctoral con plantas *slhak5*, con los obtenidos en Arabidopsis y arroz con plantas *athak5* y *oshak1* respectivamente, resultaron evidentes las diferencias en la contribución de los transportadores homólogos a HAK5 en la absorción de  $K^+$  entre las distintas especies. En las Figuras Figura 35 y Figura 45 se muestra el límite superior para la contribución de SIHAK5 a la entrada de  $K^+$ , en torno a 500  $\mu$ M  $K^+$ , que parece estar ubicado entre los límites de operación de sus homólogos de Arabidopsis y arroz, en el rango de 100-200  $\mu$ M  $K^+$  para Arabidopsis y  $>1$  mM  $K^+$  para arroz (Chen et al., 2015), (Nieves-Cordones et al., 2017) (Rubio et al., 2010; Rubio et al., 2019). Por encima de estos rangos de concentración de  $K^+$  referidos, la entrada de  $K^+$  tendría lugar a través de otros sistemas, principalmente canales del tipo AKT1. Los transportadores de  $K^+$  se consideran simportadores  $K^+$ - $H^+$  (Rodríguez-Navarro, 2000; Scherzer et al., 2015), y tienen unos requerimientos energéticos para posibilitar la entra de  $K^+$  superiores a los de los canales. Todo esto implica que la energía requerida para la absorción de  $K^+$  probablemente difiera entre las



distintas especies vegetales. Así, mientras algunas especies dependerían en mayor medida de la absorción de  $K^+$  acoplada a  $H^+$  (como arroz y tomate), otras, como *Arabidopsis*, se servirían preferentemente de los canales de  $K^+$ . Por lo tanto, queda por evaluar en qué medida es relevante la preferencia por estos dos tipos de sistemas de transporte de  $K^+$  en una especie en relación con los requisitos de energía, la aclimatación de las plantas a entornos cambiantes y, en especial, para diferentes cultivos agrícolas.

En condiciones de deficiencia de  $K^+$ , el  $Na^+$  puede complementar hasta cierto punto las funciones del  $K^+$  en la célula, mejorando el crecimiento de las plantas cuando el  $Na^+$  se acumula en la vacuola (Maathuis and Sanders, 1993; Horie et al., 2007). Esto podría explicar que las plantas del genotipo silvestre cultivadas en presencia de 50 mM de NaCl y 10  $\mu$ M  $K^+$  presentaron un mayor crecimiento y menores síntomas de clorosis que las plantas que se cultivaron sin  $Na^+$  (Figura 40), a pesar que las plantas crecidas con  $Na^+$  presentaban concentraciones de  $K^+$  en los distintos órganos estudiados inferiores a las plantas WT cultivadas sin  $Na^+$  (Figura 42). Es importante mencionar que para observar este efecto beneficioso de la presencia de  $Na^+$  en condiciones limitantes de  $K^+$ , es necesario un transportador SIHAK5 funcional, ya que el crecimiento de la línea mutante *slhak5-1* fue inferior al de las líneas silvestre y similar tanto en presencia como en ausencia de  $Na^+$  (Figura 41 A). Las plantas de esta línea presentaron una relación  $K^+/Na^+$  inferior que las plantas silvestres, lo que puede explicar su menor crecimiento en condiciones de 10  $\mu$ M  $K^+$  y 50 mM  $Na^+$  (Figura 40 A). La importancia de la relación  $K^+/Na^+$  para la tolerancia de las plantas al estrés salino ha sido ampliamente documentada (Niu et al., 1995; Wu et al., 2018). Aunque en presencia de  $Na^+$  se redujo la absorción de  $K^+$  de alta afinidad (Figura 43), los resultados muestran que se requirió la absorción de  $K^+$  mediada por SIHAK5 para mantener el crecimiento de las plantas silvestres (Figura 40 A), y las concentraciones internas de  $K^+$  (Figura 42). Por lo tanto, SIHAK5 no sólo es necesario para la absorción de  $K^+$  cuando la concentración de este elemento es limitante, sino también, para beneficiarse de la sustitución fisiológica del  $K^+$  por el  $Na^+$ . Dicho de otro modo, el crecimiento de las plantas requiere una concentración mínima de  $K^+$  en los tejidos de las mismas, y en condiciones limitantes de  $K^+$ , este valor mínimo está garantizado por la función de SIHAK5. Estos resultados indican que el papel que desarrolla SIHAK5 en tomate es similar al de AtHAK5

en *Arabidopsis*, ya que en esta especie también se requirió del transportador para el crecimiento de la planta en condiciones de deficiencia de  $K^+$  y presencia de salinidad (Nieves-Cordones et al., 2010).

La obtención de cosechas con bajos niveles de  $Cs^+$  en zonas afectadas por accidentes nucleares resulta imprescindible para los agricultores de dichas zonas. No se trata de una toxicidad para los cultivos, ya que las concentraciones de radiocesio en estos lugares está en el rango micromolar o incluso inferior (Burger and Lichtscheidl, 2018), sino para las personas y para los animales que se alimentan de ese material radiactivo, el cual puede llegar a producir importantes problemas de salud. La exposición prolongada a la radioactividad puede provocar efectos perjudiciales para la salud a largo plazo. Patologías como diversas enfermedades cardiovasculares o cáncer, se han relacionado con la exposición a bajos niveles de radiación presentes en el medio ambiente, los cuales no provocan efectos inmediatos en la salud, pero resultan un factor de riesgo para en la aparición de cáncer. El radiocesio puede llegar a las raíces de los cultivos bien porque se encuentre depositado en el suelo o porque esté presente en el agua de riego (Nagao et al., 2013; Yasutaka et al., 2014). A estas bajas concentraciones, el radiocesio puede ser absorbido por las raíces de las plantas y acumulado en los órganos comestibles, por lo que la absorción de  $Cs^+$  es un proceso crítico para reducir la acumulación de este elemento en la planta.

La obtención de plantas con versiones de transportadores HAK5 que permitieran disminuir la absorción de  $Cs^+$ , puede ser una solución viable, ya que como se ha demostrado, el aumento de las aportaciones de fertilizantes potásicos o la eliminación de las capas del suelo contaminadas por  $Cs^+$ , han resultado caras y peligrosas (Ohmori et al., 2014; Sakai et al., 2014; Lepage et al., 2015; Fujimura et al., 2016; Wakabayashi et al., 2016). Se ha demostrado que los transportadores tipo HAK como AtHAK5 y OsHAK1 son vías importantes para la entrada de  $Cs^+$  en *Arabidopsis* y arroz respectivamente, especialmente en plantas crecidas en condiciones limitantes de  $K^+$  (Genies et al., 2017; Nieves-Cordones et al., 2017; Rai et al., 2017). Un estudio farmacológico reciente sugirió que esto podría ser igualmente válido para el transportador SlHAK5 en plantas de tomate (Rodenas et al., 2018).

En la presente Tesis Doctoral se muestra que la eliminación de SIHAK5 reduce significativamente la entrada de Cs<sup>+</sup> en la planta cuando se ayunan de K<sup>+</sup> y se cultivan con 20 μM de Cs<sup>+</sup> (Figura 37). Además, la actividad de SIHAK5 también fue relevante para la acumulación de Cs<sup>+</sup> en las plantas cultivadas con K<sup>+</sup> suficiente en la solución y una concentración constante de 20 μM de Cs<sup>+</sup> (Figura 38 A). Desde el punto de vista agronómico, es importante destacar que, los frutos de la línea *slhak5-1*, órgano con valor comercial, mostraron un factor de transferencia de Cs<sup>+</sup> muy bajo (TF fruto = 8.5 ± 0.7) en comparación con los frutos WT (TF fruto = 151.6 ± 28). Este factor de transferencia se calculó como la relación entre el Cs<sup>+</sup> que contiene cada uno de los órganos estudiados y el Cs<sup>+</sup> del medio de cultivo. Las condiciones de cultivo empleadas, 300 μM K<sup>+</sup> y 20 μM Cs<sup>+</sup> dieron lugar a concentraciones de Cs<sup>+</sup> mucho más bajas en todos los órganos de la línea mutante *slhak5-1* en comparación con el genotipo silvestre (Figura 38 A), sin observarse efectos notables en la concentración de K<sup>+</sup> (Figura 38 B). Sin embargo, el tamaño de los frutos de las plantas *slhak5-1* resultó menor que el de los frutos WT (Figura 47 B), por lo que sería deseable separar la contribución de SIHAK5 a la absorción de Cs<sup>+</sup> de la raíz de su contribución al desarrollo del fruto. Para ello, un posible enfoque, sería reemplazar el gen *SIHAK5* nativo con variantes alélicas que presenten una selectividad mejorada K<sup>+</sup>/Cs<sup>+</sup>, de forma que se mantendría la función de transporte de K<sup>+</sup> en los órganos reproductores, al mismo tiempo que se reduce la absorción de Cs<sup>+</sup> de la raíz. Un ejemplo de ello sería el mutante F130S de *AtHAK5*, el cual presenta una selectividad K<sup>+</sup>/Cs<sup>+</sup> más alta que el transportador nativo sin penalizar su actividad de transporte de K<sup>+</sup> (Aleman et al., 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, la mutación *slhak5* supuso un problema para la producción de frutos y semillas. Esta disminución en la producción de frutos y semillas no se debió a un efecto ocasionado por deficiencia de K<sup>+</sup>, ya que en condiciones de cultivo con suficiente K<sup>+</sup> en la solución, tanto las plantas mutantes *slhak5-1* como las silvestres, mostraron concentraciones de K<sup>+</sup> similares (Figura 33), sin embargo, el tamaño de los frutos y el número de semillas por fruto resultaron significativamente distintos (Figura 46 y Figura 47 C). El motivo de estas diferencias puede deberse a un problema en la fecundación del óvulo. Se ha demostrado que una mejor polinización aumenta la producción y calidad del fruto de tomate (Franceschinelli et al., 2013), de forma que, la baja tasa de germinación del polen de la línea *slhak5-1* (Figura 49 C), junto con la reducida

longitud el tubo polínico de los granos de polen de la línea mutante (Figura 50), podrían estar dando lugar a una reducción en la fertilización del óvulo. Teniendo en cuenta que el gen que codifica SIHAK5 se expresó en los estambres (Figura 48), es muy probable que SIHAK5 desempeñe un papel directo en la fisiología del polen. La acumulación de  $K^+$  en los granos de polen es necesaria para mantener la viabilidad del polen y el adecuado alargamiento del tubo polínico (Fan et al., 2001; Mähns et al., 2013). La adecuada concentración de  $K^+$  en los granos de polen es necesaria para generar una turgencia suficiente que permita que el tubo polínico se elongue (Weisenseel and Jaffe, 1976). La menor tasa de germinación del polen (Figura 49 C), las concentraciones de  $K^+$  inferiores en el grano de polen (Figura 52 B) y la menor longitud de los tubos polínicos (Figura 50) de la línea mutante, podrían ser debidas a la ausencia de SIHAK5. Resulta interesante destacar que OsHAK1 también se ha relacionado con la fertilidad del arroz y la viabilidad del polen (Chen et al., 2018).

Se ha sugerido que los transportadores HAK de alta afinidad median la entrada de  $K^+$  en las células de la raíz en cotransporte con  $H^+$  (Rodríguez-Navarro, 2000). Por ello se plantea la cuestión de que este mecanismo de transporte también esté involucrado en la fisiología del polen. El crecimiento polarizado del tubo polínico requiere el funcionamiento de sistemas de transporte específicos en ciertas regiones del tubo (Michard et al., 2017). Es posible que, en algunos puntos, o momentos puntuales del desarrollo del tubo polínico, sea necesario un gradiente de  $H^+$  para que se produzca el acoplamiento de  $H^+$  y entre  $K^+$  a la célula. Además, los gradientes de  $H^+$  dentro del tubo polínico se han relacionado con su crecimiento polarizado (Weisenseel and Jaffe, 1976), siendo el pH del ápice del tubo polínico menor que en la zona subapical del mismo, pudiendo actuar el  $H^+$  en cascadas de señalización (Michard et al., 2017). Por todo lo dicho, un simporte de  $K^+/H^+$  puede servir como mecanismo para la acumulación de  $K^+$ , así como para el movimiento de  $H^+$  para generar gradientes de concentración de  $H^+$ .

Es importante destacar que, a pesar de la baja viabilidad de los granos de polen de la línea *slhak5*, las plantas producían frutos. Esto puede ser debido a la capacidad de las flores de tomate de producir frutos partenocárpicos (Srivastava and Handa, 2005). No obstante, los frutos de la línea *slhak5-1* eran de menor tamaño que los de la línea silvestre (Figura 47 A), probablemente debido al menor

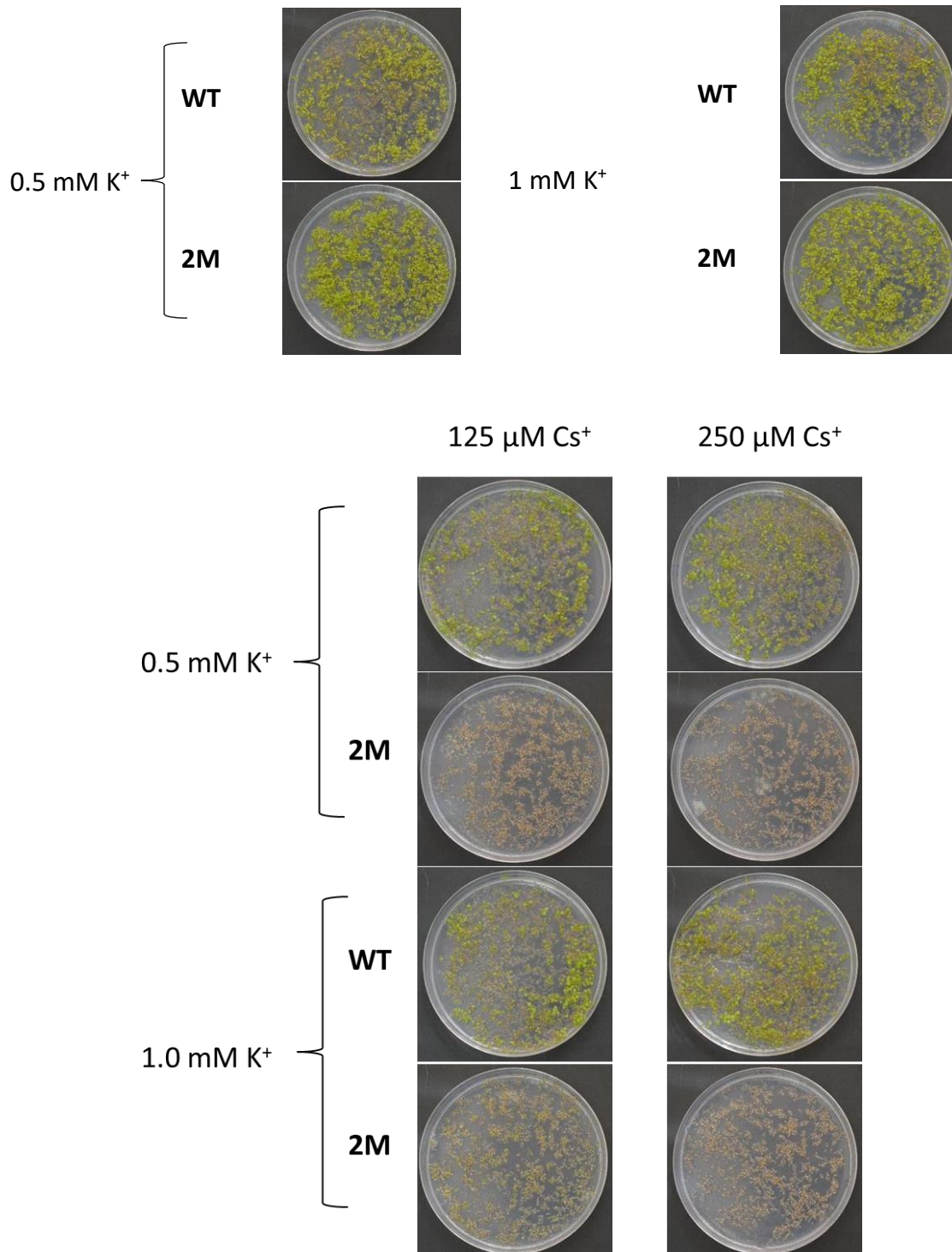
número de semillas de esta línea (Figura 47 C), ya que el número de semillas del fruto influye de forma importante en el tamaño y peso final del mismo (Varoquaux et al., 2000). La característica de frutos partenocárpicos de la línea *slhak5* es de gran interés para la industria del tomate, existiendo aproximadamente unas 100 patentes sobre este tema en la base de datos de patentes de Google, las cuales pueden tener aplicación biotecnológica. Concretamente, la ausencia de semillas en el fruto del tomate es importante para la elaboración de salsas de tomate, ya que éstas dificultan el proceso de extracción del zumo (Varoquaux et al., 2000). Además de esto, los tomates sin semillas resultan más sabrosos y tienen una vida útil más larga que los tomates con semillas (Varoquaux et al., 2000). Existen varios cultivares de tomate partenocárpicos naturales, pero tienen desventajas debido a los efectos pleiotrópicos de los genes involucrados (Varoquaux et al., 2000). En el caso de las plantas *slhak5*, no se observaron otros defectos notables en el fenotipo de la planta, salvo que la concentración externa de  $K^+$  fuera inferior a  $300 \mu M$  durante un periodo demasiado prolongado de tiempo.

Por todo lo dicho, se ha demostrado que SIHAK5 es el principal responsable de la absorción de  $K^+$  en el rango de la alta afinidad a través de la raíz. Además, se ha puesto de manifiesto la importancia de este transportador en condiciones de salinidad, en las que el funcionamiento de SIHAK5 es imprescindible para, además de mantener unos niveles mínimos de  $K^+$  en el interior de la célula, permitir el aprovechamiento de cationes como el  $Na^+$  para realizar el ajuste osmótico mediante su acumulación en la vacuola y un mejor desarrollo de la planta en condiciones de estrés salino. Por otro lado, se ha observado que este transportador, además de estar actuando en la raíz, lo hace en distintos órganos de la planta, teniendo una función determinante en el proceso de germinación del grano de polen. La mutación de *SIHAK5* permite la obtención de frutos con niveles de  $Cs^+$  muy bajos cuando las plantas son cultivadas en zonas con presencia de este elemento tóxico para los animales, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo, pueden servir para un futuro enfoque biotecnológico con el cual abordar el problema que supone la obtención de alimentos en zonas afectadas por radiocesio.

#### 4.3. CAPÍTULO 3: IDENTIFICACIÓN DE UN SISTEMA DE ABSORCIÓN DE K<sup>+</sup> DISTINTO DE ATHAK5 Y AKT1

##### **4.3.1. Elección de las condiciones de selección de las semillas mutagenizadas**

Tal y cómo se ha descrito en trabajos previos del grupo, la línea de *Arabidopsis* mutante *athak5akt1* es más sensible a Cs<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> que el genotipo silvestre Col-0 (Caballero et al., 2012). Esta mayor sensibilidad era debida a que en la línea *athak5akt1*, la entrada de K<sup>+</sup> tenía lugar a través de un sistema de entrada de cationes no selectivo, que permitía una mayor entrada de Cs<sup>+</sup> y se inhibía por Ca<sup>2+</sup>. Así, la presencia de Cs<sup>+</sup> resultaba en una relación K<sup>+</sup>/Cs<sup>+</sup> en el interior de la planta incompatible con el crecimiento de la misma. Por otra parte, la presencia de Ca<sup>2+</sup> inhibía la entrada de K<sup>+</sup>, y la planta sufría deficiencia del último, limitándose su crecimiento. Esta línea *athak5akt1* podía utilizarse para seleccionar mutantes de la misma en el sistema por el que entra el K<sup>+</sup>, más selectivos por el mismo, que presentaran una menor entrada de Cs<sup>+</sup> o una menor inhibición por Ca<sup>2+</sup>, y crecimiento en presencia de Cs<sup>+</sup> o Ca<sup>2+</sup>. Siguiendo este razonamiento se procedió a generar mutantes en la línea *athka5akt1* mediante tratamiento químico y posterior selección de plantas que crecieran en presencia de Cs<sup>+</sup> o Ca<sup>2+</sup>. Con el fin de determinar las mejores condiciones de selección de estas plantas mutantes, se estudió el crecimiento de la línea silvestre y la línea *athak5akt1* en medio sólido con Cs<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Las semillas de ambas líneas se esterilizaron empleando el protocolo que se detalla en el apartado de Materiales y Métodos y seguidamente, se sembraron en medio sólido en placa conteniendo 1/5H sin K<sup>+</sup>, al que se adicionaron distintas cantidades de K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. En experimentos preliminares se determinó el rango de concentraciones de cada uno de estos cationes y finalmente se utilizaron las concentraciones indicadas en la Figura 54.



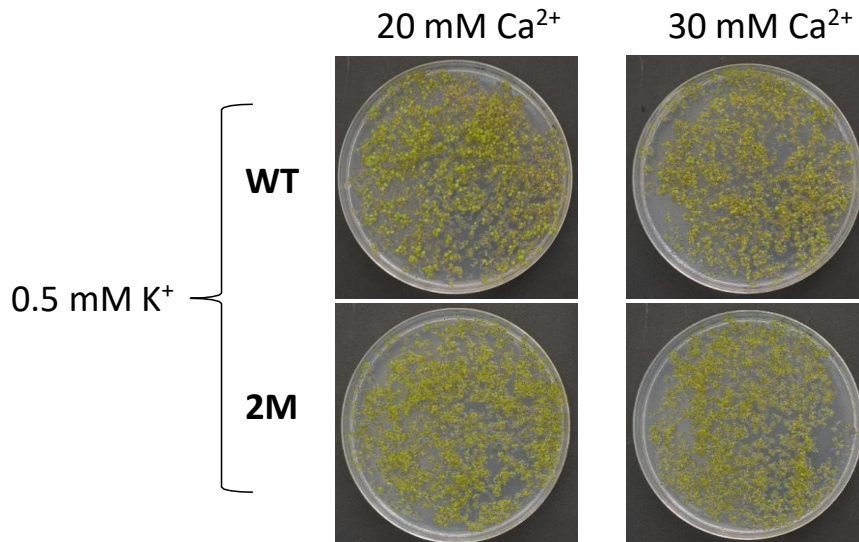


Figura 54. Ensayo de las condiciones de selección de plantas de *Arabidopsis* tolerantes a Cs<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Las semillas del genotipo silvestre (WT) y del doble mutante *athak5akt1*(2M) se esterilizaron y se sembraron en placas medio sólido, empleando como medio de cultivo 1/5H sin K<sup>+</sup> al que se adicionaron distintas cantidades de K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>.

Una vez realizados los ensayos anteriores, y teniendo en cuenta el fenotipo de ambas líneas en cada uno de los medios empleados, se decidió utilizar como medio selectivo para las semillas procedentes de la mutagénesis, por un lado 1/5H con 0,5 mM K<sup>+</sup> y 125 μM Cs<sup>+</sup> y, por otro lado, 1/5H con 0,5 mM K<sup>+</sup> y 20 mM Ca<sup>2+</sup>. Las condiciones de 0,5 mM K<sup>+</sup> +125 μM Cs<sup>+</sup> se consideraron óptimas para este experimento puesto que el genotipo silvestre crecía adecuadamente, mientras que el mutante *athak5akt1* no lo hacía. Estas condiciones no producían ningún efecto de toxicidad sobre el genotipo silvestre, lo que permitiría seleccionar aquellas plantas tolerantes a la presencia de Cs<sup>+</sup> en el medio. En los medios con Ca<sup>2+</sup>, las diferencias entre las líneas no eran tan evidentes como en el caso anterior, sin embargo, las plantas del genotipo silvestre alcanzaban un mayor tamaño, permitiendo diferenciarlas así del genotipo *athak5akt1*. Por ello, se decidió emplear 20 mM de Ca<sup>2+</sup> y no 30 mM, para evitar posibles efectos no deseados de una concentración tan alta de este ion.



#### 4.3.2. Experimentos preliminares de absorción de Cs<sup>+</sup>

Los experimentos de crecimiento en placa con distintas concentraciones de Cs<sup>+</sup> daban lugar a un fenotipo diferencial claro entre la línea silvestre y la mutante *athak5akt1*. Esto podría permitir la selección de mutantes de la línea *athak5akt1* más tolerantes a Cs<sup>+</sup>. Para profundizar en el comportamiento de las plantas en presencia de Cs<sup>+</sup>, se diseñaron unos experimentos para determinar la acumulación del mismo, así como las concentraciones de K<sup>+</sup> interno en las plantas cultivadas en las condiciones que se emplearían para la selección de mutantes. Para ello se utilizaron las líneas de *Arabidopsis* Col-0 y el doble mutante *athak5akt1*. Las plantas se crecieron en cultivo hidropónico durante 28 días en solución 1/5H con 1,4 mM de K<sup>+</sup>, y transcurrido este tiempo, se cambió la solución de cultivo a 1/5H sin K<sup>+</sup>, a la que se adicionó KCl (0,5 y 1 mM) y CsCl (125 y 250 μM). Las plantas permanecieron con los tratamientos con distinta concentración de K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> durante 7 días, para posteriormente, cosecharlas y determinar la concentración de K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> de la planta.

El primer parámetro que se analizó fue el tamaño de las plantas. Como se pudo observar en el peso seco de la parte aérea, los distintos tratamientos utilizados en el ensayo no afectaron significativamente al tamaño de la roseta, a excepción del tratamiento con 1 mM de K<sup>+</sup> y 250 μM de Cs<sup>+</sup>, el cual produjo una disminución de aproximadamente un 30% en el peso seco de la parte aérea de ambas líneas con respecto al control sin Cs<sup>+</sup> (Figura 55 A).

Respecto al tamaño de la raíz (Figura 55 B), los resultados obtenidos siguieron la misma tendencia que en el caso de la parte aérea. Fue el tratamiento con 1 mM de K<sup>+</sup> y 250 μM de Cs<sup>+</sup> en el que se observaba una disminución del tamaño de la raíz de ambos genotipos.

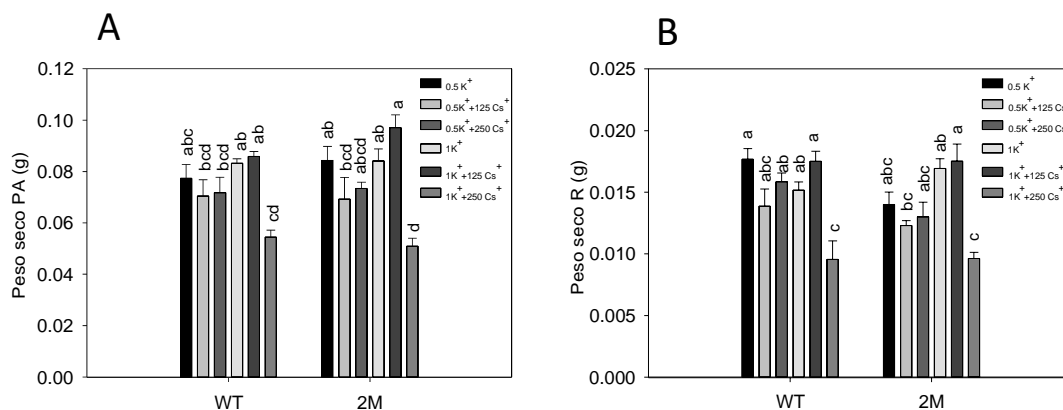


Figura 55. Peso seco de parte aérea (A) y raíz (B) de plantas de *Arabidopsis* con distintos tratamientos de Cs<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Plantas WT y *athak5akt1*(2M) se crecieron en solución nutritiva con 1,4 mM de K<sup>+</sup> durante 28 días y seguidamente se cambiaron a soluciones que contenían 0,5 ó 1 mM K<sup>+</sup> y 125 ó 250 μM Cs<sup>+</sup>, manteniéndose estos tratamientos durante 7 días. Trascurrido este tiempo, las plantas se separaron en parte aérea y raíz, se secaron y se determinaron los pesos secos de la parte aérea y de la raíz. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey.

Las muestras de parte aérea y raíz de las plantas se procesaron para determinar las concentraciones internas de K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>. Observando los resultados de la concentración de K<sup>+</sup> de la parte aérea (Figura 56 A), en la línea silvestre los valores se encontraban en torno a 0,6 y 0,8 mmol gPS<sup>-1</sup> en todos los tratamientos, a excepción del tratamiento con 1 mM de K<sup>+</sup> sin Cs<sup>+</sup>, cuya concentración de K<sup>+</sup> era cercana a 1 mmol gPS<sup>-1</sup>. Únicamente existieron diferencias significativas de este último tratamiento con el resto. Los valores de la concentración de K<sup>+</sup> de las plantas *athak5akt1* oscilaron entre 0,5 y 0,6 mmol gPS<sup>-1</sup>, no existiendo diferencias significativas entre ellas. Por lo tanto, la línea mutante presentó concentraciones de K<sup>+</sup> ligeramente inferiores a las de WT, sin embargo, únicamente resultaron significativas en los tratamientos que no contenían Cs<sup>+</sup>.

En la raíz (Figura 56 B), también se observaron diferencias entre los tratamientos con Cs<sup>+</sup> y sin él así como entre los genotipos. En la línea WT, el Cs<sup>+</sup> disminuyó la concentración de K<sup>+</sup> en presencia de 0,5 mM K<sup>+</sup> externo, pero no en presencia de 1 mM. En la línea *athak5akt1*, la presencia de Cs<sup>+</sup> disminuyó la

concentración de  $K^+$  a 0,5 mM  $K^+$  externo y a 1 mM  $K^+$  externo con 125  $\mu M$   $Cs^+$ . En general, las concentraciones de  $K^+$  eran menores en la línea mutante que en la WT, aunque las diferencias no eran significativas en todos los casos. La concentración de  $K^+$  en la raíz de las plantas silvestres osciló entre 1 y 1,3 mmol  $gPS^{-1}$ , mientras que en el mutante lo hacía entre 0,7 y 1,1 mmol  $gPS^{-1}$ .

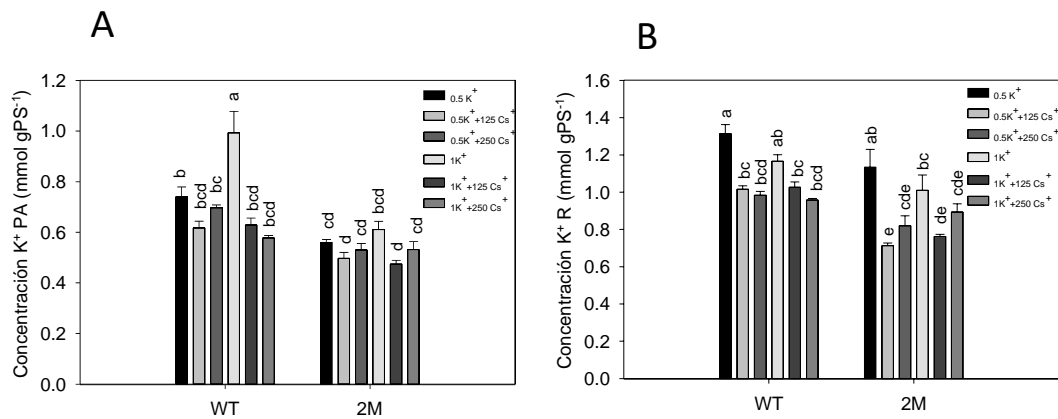


Figura 56. Concentración de  $K^+$  en parte aérea (A) y raíz (B) en plantas de *Arabidopsis* con distintos tratamientos de  $Cs^+$  y  $K^+$ . Las plantas WT y *athak5akt1*(2M) se cultivaron y trataron tal y como se indica en la Figura 55. Tras separar las plantas en parte aérea y raíz, se secaron y se realizó una digestión del material vegetal para determinar la concentración interna de  $K^+$ . En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

Respecto a las concentraciones de  $Cs^+$  en la parte aérea (Figura 57 A), se observó que el aumento de  $K^+$  en la solución no se traducía en una disminución de la concentración de  $Cs^+$  en la parte aérea ya que, las concentraciones de  $Cs^+$  que presentaban las plantas crecidas con 0,5 y 1 mM de  $K^+$  no resultaron estadísticamente distintas entre ellas ni entre las líneas estudiadas. Únicamente, resultó significativa la diferencia entre plantas WT crecidas con 0,5 mM  $K^+$  y 250  $\mu M$   $Cs^+$  y *athak5akt1* cultivadas con 1 mM  $K^+$  y 250  $\mu M$   $Cs^+$ . En cambio, se observó que el aumento de la concentración de  $Cs^+$  en la solución de cultivo, sí producía un claro aumento de la concentración de  $Cs^+$  en la parte aérea de ambos genotipos.

En cuanto a la concentración de  $\text{Cs}^+$  en la raíz (Figura 57 B), las diferencias observadas entre la línea silvestre y la mutante resultaron significativas. En este caso, la concentración de  $\text{Cs}^+$  que presentaban las raíces de plantas WT crecidas en solución con 0,5 mM  $\text{K}^+$  y 125  $\mu\text{M}$   $\text{Cs}^+$  era próxima a 10  $\mu\text{mol gPS}^{-1}$  mientras que la línea mutante *athak5akt1* presentaba una concentración 3 veces mayor. Cuando las plantas crecieron con 0,5 mM  $\text{K}^+$  y 250  $\mu\text{M}$   $\text{Cs}^+$  los resultados fueron semejantes a los anteriores. En el resto de condiciones, aunque la tendencia resultó la misma y las diferencias entre las líneas también fueron estadísticamente significativas, no resultaron tan marcadas.

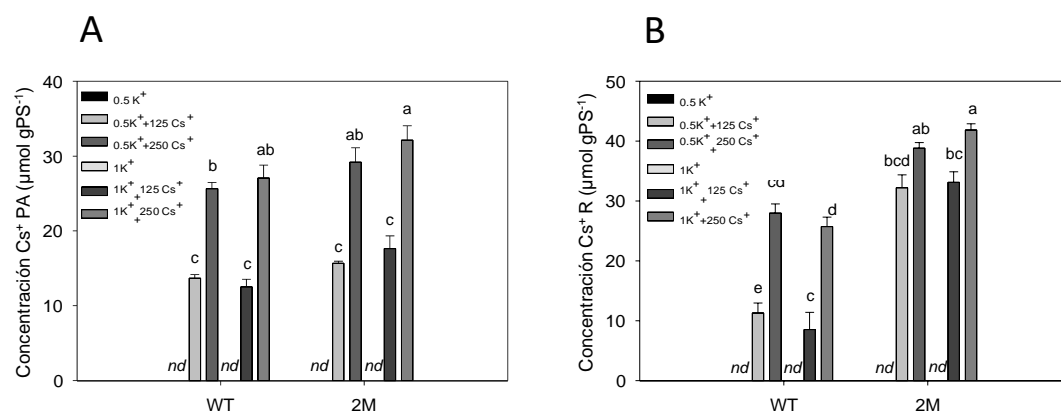


Figura 57. Concentración de  $\text{Cs}^+$  en parte aérea (A) y raíz (B) en plantas de *Arabidopsis* con distintos tratamientos de  $\text{Cs}^+$  y  $\text{K}^+$ . Las plantas WT y *athak5akt1*(2M) se cultivaron y trataron tal y como se indica en la Figura 55. Tras separar las plantas en parte aérea y raíz, se secaron y se realizó una digestión del material vegetal para determinar la concentración interna de  $\text{Cs}^+$ . En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey. No se determinó la concentración de  $\text{Cs}^+$  en los tratamientos sin  $\text{Cs}^+$ , lo que se indica con *nd*.

La entrada de  $\text{Cs}^+$  se calculó como la cantidad de  $\text{Cs}^+$  presente en el interior de la planta ( $\mu\text{mol}$ ) dividida por el peso seco de la raíz (g) (Figura 58). Se observó que para los dos tratamientos con 0,5 mM de  $\text{K}^+$ , la entrada de  $\text{Cs}^+$ , tanto en presencia de 125 como de 250  $\mu\text{M}$   $\text{Cs}^+$ , era mayor en el genotipo *athak5akt1* que en el silvestre. La línea WT presentó en el tratamiento de 0,5 mM de  $\text{K}^+$  y 125  $\mu\text{M}$  de

Cs<sup>+</sup> una entrada de Cs<sup>+</sup> de aproximadamente 50  $\mu\text{molgPS}^{-1}\text{ R}$ , aumentando tres veces cuando la concentración de Cs<sup>+</sup> en el medio era de 250  $\mu\text{M}$ .

En los tratamientos con 1 mM de K<sup>+</sup> no se observaron diferencias significativas en la entrada de Cs<sup>+</sup> entre las líneas estudiadas y las distintas concentraciones de Cs<sup>+</sup> empleadas. Excepto la línea WT con 250  $\mu\text{M}$  de Cs<sup>+</sup> que presentó una entrada de 100  $\mu\text{molgPS}^{-1}\text{ R}$ , en el resto de condiciones, los valores de entrada de Cs<sup>+</sup> fueron próximos a 150  $\mu\text{molgPS}^{-1}\text{ R}$ .

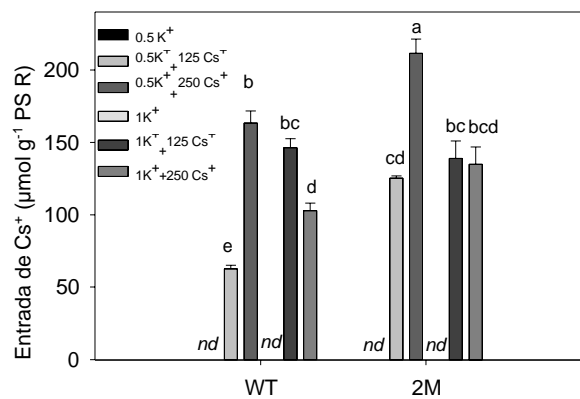


Figura 58. Entrada de Cs<sup>+</sup> en plantas de *Arabidopsis* con distintos tratamientos de Cs<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Las plantas WT y *athak5akt1(2M)* se cultivaron y trataron tal y como se indica en la Figura 55. La entrada de Cs<sup>+</sup> se calculó como la cantidad de Cs<sup>+</sup> presente en el interior de la planta ( $\mu\text{mol}$ ) dividida por el peso seco de la raíz (g). En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey. No se determinó la concentración de Cs<sup>+</sup> en los tratamientos sin Cs<sup>+</sup>, lo que se indica con *nd*.

Se calculó la relación Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de ambos genotipos para cada uno de los tratamientos y se observó que, en la parte aérea (Figura 59 A) esta relación resultaba más desfavorable en el genotipo mutante que en el silvestre, observándose diferencias significativas entre las líneas en todos los tratamientos aplicados, excepto cuando las plantas se cultivaron con 0,5 mM K<sup>+</sup> y 125  $\mu\text{M}$  Cs<sup>+</sup>.

En la raíz (Figura 59 B), los resultados eran más evidentes que en el caso anterior, observándose claras diferencias entre ambos genotipos. En el

tratamiento con 0,5 mM K<sup>+</sup> y 125 μM Cs<sup>+</sup>, la relación Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> del genotipo silvestre es aproximadamente 0,01, mientras que en el caso del mutantes es 0,045. En el resto de tratamientos se observa la misma tendencia, aunque las diferencias resultaron menores en las concentraciones más altas de Cs<sup>+</sup> en la solución. La relación Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> no fue significativamente distinta en los tratamientos de 0,5 y 125 μM Cs<sup>+</sup> y 1 mM K<sup>+</sup> y 250 μM Cs<sup>+</sup>. Es importante destacar que, en la raíz del mutante *athak5akt1*, las distintas concentraciones de K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> ensayadas no produjeron distintas relaciones Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en este órgano, presentando valores semejantes en todas ellas.

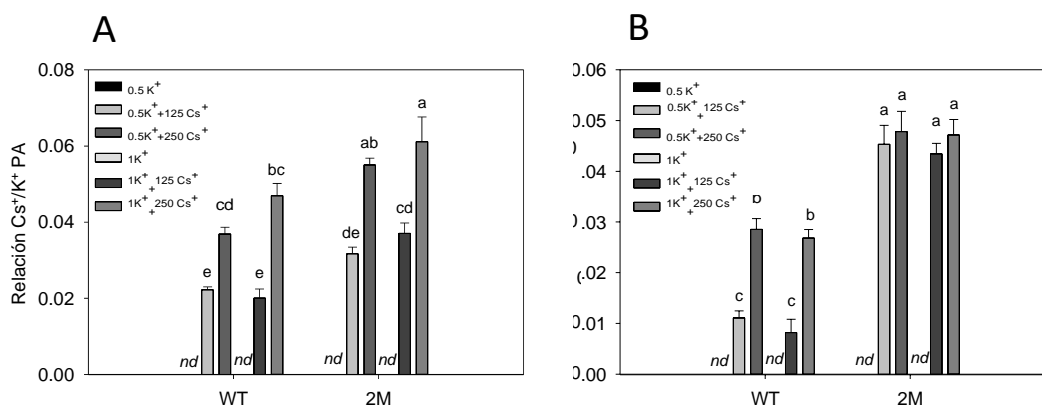


Figura 59. Relación Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de la parte aérea (A) y raíz (B) en plantas de *Arabidopsis* con distintos tratamientos de Cs<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Las plantas WT y *athak5akt1*(2M) se cultivaron y trataron tal y como se indica en la Figura 55. A partir de los datos representados en las gráficas anteriores de la concentración de K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> de cada una de las líneas y para cada uno de los tratamientos, se calculó la relación Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de parte aérea y raíz de las líneas estudiadas. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey. No se determinó la concentración de Cs<sup>+</sup> en los tratamientos sin Cs<sup>+</sup>, lo que se indica con *nd*.

### 4.3.3. Mutagénesis

Para la generación de mutantes en la línea *athak5akt1* se utilizó EMS. La determinación de la dosis de mutágeno correcta resulta clave para que el proceso de mutagénesis resulte exitoso. Son muchos los factores que pueden afectar a este proceso, desde el estado de las semillas, a la temperatura de la solución de mutagénesis, pasando por el grado de pureza del EMS. Basándonos en trabajos ya publicados (Jander et al., 2003; Maple and Møller, 2007), en los que se recomienda ensayar un gradiente de dosis de mutágeno, se llevó a cabo un estudio preliminar para determinar la concentración óptima de mutágeno en la solución. Para ello, se realizó un experimento en el que se ensayaron tres concentraciones distintas, 0,04, 0,2 y 0,4% de EMS en la solución de mutagénesis. Para cada una de estas concentraciones se mutagenizaron 150.000 semillas de la línea *athak5akt1*, incubando las semillas durante 8 horas en presencia del mutágeno. Tras el proceso de mutagénesis, las semillas de cada tratamiento se sembraron en bandejas con sustrato, compuesto por turba, vermiculita y perlita en una proporción 3:2:1, con el fin de crecer las plantas y obtener semillas a partir de ellas, guardando parte de las semillas mutagenizadas para realizar el control del proceso en placa. Para ello, se sembraron de cada tratamiento tres placas con medio 1/5H (1,4 mM K<sup>+</sup>) solidificado con agar para realizar el conteo de semillas germinadas y el porcentaje de plantas albinas de la M1. El objetivo del conteo de estas dos variables fue evaluar el grado de saturación en el proceso de la mutagénesis, el cual puede determinarse a través de la detección de rasgos recesivos visibles como el albinismo o la letalidad embrionaria (Grini et al., 1999).

De los tres tratamientos se observó que el primero de ellos, 0,04% EMS, presentó un porcentaje de germinación demasiado alto (74,3%). Puesto que en la literatura se indicaba que el porcentaje de semillas que germinara tras el proceso de mutagénesis debía ser próximo al 50%, se decidió eliminar las plantas de este tratamiento y seguir adelante con las plantas de los otros dos tratamientos.

En la Tabla 27 se muestran los resultados obtenidos del conteo de cada uno de los tratamientos. El porcentaje de germinación del tratamiento con 0,2% fue del 42% y del 38% para el de 0,4% de EMS. El porcentaje de plantas albinas en la M1 fue del 7,8% y 1,25% para los tratamientos con 0,2 y 0,4% de EMS

respectivamente. Así, se utilizaron los dos tratamientos con EMS, 0,2 y 0,4%, para la generación de los mutantes.

Tabla 27. Porcentaje de germinación y de plantas albinas en la M1 para cada uno de los tratamientos de mutagénesis realizados.

Tratamiento	% Germinación	% Albinas
0,04 % EMS	74,3	0,93
0,2 % EMS	42,0	7,80
0,4 % EMS	38,0	1,25

#### 4.3.4. Selección de líneas tolerantes

Tras sembrar las semillas sometidas al proceso de mutagénesis (M1) y recoger las semillas producidas por éstas (M2), se llevó a cabo la selección de plantas tolerantes a  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Para ello, se sembraron las semillas en medio sólido en placa utilizando las condiciones que se habían seleccionado en el apartado 4.3.1. ( $0,5 \text{ mM K}^+ + 125 \mu\text{M Cs}^+$  y  $0,5 \text{ K}^+ + 20 \text{ mM Ca}^{2+}$ ).

Se seleccionaron diferentes líneas que resultaron tolerantes a  $\text{Cs}^+$  y a  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabla 28).

Tabla 28. Líneas mutantes seleccionadas en  $0,5 \text{ mM K}^+ + 125 \mu\text{M Cs}^+$  y  $0 \text{ K}^+ + 20 \text{ mM Ca}^{2+}$ .

Resumen final de líneas seleccionadas	
EMS1* EMS3* EMS5 EMS8 EMS9 EMS13 EMS23 EMS28	$0,5 \text{ mM K}^+ + 125 \mu\text{M Cs}^+$
EMS59 EMS61	$0 \text{ K}^+ + 20 \text{ mM Ca}^{2+}$



\* No producen semillas en las siguientes generaciones, por lo que se pierde la línea.

Una vez seleccionadas las plantas tolerantes a Cs<sup>+</sup>, y antes de realizar los siguientes experimentos de caracterización, se comprobó la interrupción de los genes *AtHAK5* y *AKT1* por la inserción de AND-T, para confirmar que se trataban de mutantes *athak5akt1* y no de una posible contaminación de semillas silvestres que las hicieran crecer en el medio selectivo. Para ello se amplificaron por PCR las regiones de ADN genómico correspondientes a los genes *AtHAK5* y *AKT1* en el punto de inserción de ADN-T así como a las regiones adyacentes a los puntos de inserción de ADN-T en los genes *AtHAK5* y *AKT1*, empleando las siguientes parejas de cebadores (Tabla 29):

Tabla 29. Cebadores empleados para la comprobación de la inserción de ADN-T en *AtHAK5* y *AKT1* de plantas *athak5akt1* mutagenizadas tolerantes a Cs<sup>+</sup>.

Cebador	Secuencia
AtHAK5-F	CAATTGCACATGCTAAAAGACAGT
AtHAK5-R	CACCAGTGATGCAGAGGAAAAC
AKT1-F	CATTTATGAGGATCGGAAACAAG
AKT1-R	GGCTTTCTCAAGAACCCAAAC
LBb1.1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAAC

Como se puede observar en la Figura 60, se comprobó que las 8 líneas seleccionadas en presencia de Cs<sup>+</sup> y las 2 en presencia de Ca<sup>2+</sup> eran mutantes *athak5akt1*. Tras la amplificación de los genes *AtHAK5*, *AKT1* y las respectivas regiones adyacentes al ADN-T empleando la PCR, se comprobó mediante electroforesis la ausencia de amplificación de ADN en las reacciones correspondientes a los genes *AtHAK5* y *AKT1* (Figura 60 A y B), así como la amplificación del fragmento de ADN del tamaño adecuado en las reacciones correspondientes a la región adyacente al ADN-T (Figura 60 C).

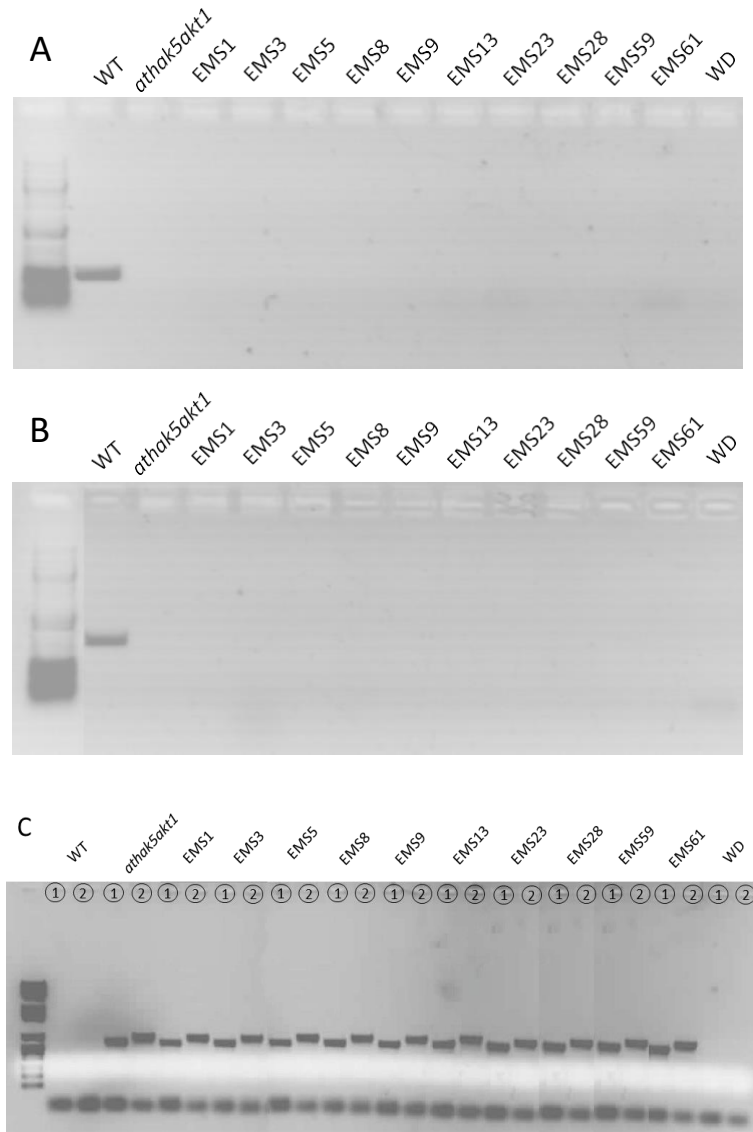


Figura 60. Electroforesis de los productos de PCR de comprobación de las líneas mutantes obtenidas de la mutagénesis con EMS. A) Amplificación de *AtHAK5* en el genotipo silvestre, mutante *athak5akt1* y de los mutantes de EMS. B) Amplificación de *AKT1* en el genotipo silvestre, mutante *athak5akt1* y de los mutantes de EMS. C) Amplificación de las regiones adyacentes al ADN-T en el genotipo silvestre, mutante *athak5akt1* y de los mutantes de EMS. En los carriles con el número 1 se cargó el producto de PCR de la amplificación de la región adyacente al ADN-T correspondiente al gen *AtHAK5* y en los carriles con el número 2, al de *AKT1*.

#### 4.3.5. Experimentos de caracterización de las líneas tolerantes

Tras la selección de líneas tolerantes, se procedió a la caracterización fisiológica en cultivo hidropónico de las líneas seleccionadas en presencia de  $\text{Cs}^+$ . Para ello, previamente, las semillas de la M3 se sembraron en placa empleando el mismo medio selectivo con  $\text{Cs}^+$  ( $0,5 \text{ mM K}^+$  y  $125 \text{ } \mu\text{M Cs}^+$ ) y una vez las plántulas habían desarrollado las dos primeras hojas verdaderas, se pasaron a cultivo hidropónico. En todos los casos, junto con las semillas mutagenizadas, se sembraba en placa la línea silvestre y el doble mutante *athak5akt1* como controles. Previamente a la realización de los experimentos, las plantas seleccionadas del medio con  $\text{Cs}^+$  se analizaron por PCR para comprobar que eran mutantes *athak5akt1*.

Para esta caracterización de las líneas seleccionadas, se decidió comenzar con las tres que mayor crecimiento presentaban en la primera selección de la M1. Estas tres líneas fueron la EMS8, EMS9 y EMS23. Los primeros ensayos de caracterización se realizaron utilizando las mismas condiciones de cultivo que en los ensayos preliminares con el genotipo silvestre y el mutante *athak5akt1*. Para ello, una vez seleccionadas las plántulas que mejor desarrollo presentaban en el medio con  $\text{Cs}^+$ , se pasaron a hidropónico con solución nutritiva 1/5H ( $1,4 \text{ mM K}^+$ ) durante 28 días. A continuación, las plantas se cambiaron a una solución con  $0,5 \text{ mM K}^+$  y  $125 \text{ } \mu\text{M Cs}^+$ . Las líneas seleccionadas con  $\text{Ca}^+$  no se utilizaron para estos primeros experimentos puesto que como se ha dicho anteriormente, se decidió comenzar por las líneas que mostraron un fenotipo más claro en la primera selección tras la mutagénesis.

Observando el peso seco de las plantas (Figura 61), se comprobó que no existían diferencias significativas en el peso de la parte aérea entre las distintas líneas estudiadas a excepción de la línea EMS8, la cual presentaba un menor tamaño que el resto (Figura 61 A). En la raíz tampoco se apreciaron grandes diferencias entre líneas, aunque las líneas EMS8 y EMS23 presentaban un menor peso seco que el resto (Figura 61 B).

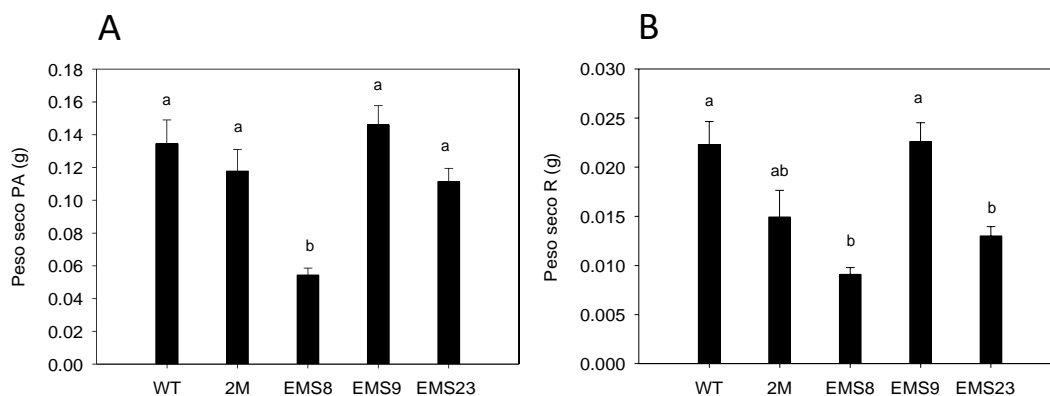


Figura 61. Peso seco de la parte aérea (A) y de la raíz (B) de distintas líneas de *Arabidopsis* crecidas en 0,5 mM de  $K^+$  y 125  $\mu M$  de  $Cs^+$ . Plantas WT, *athak5akt 1*(2M) y de las líneas seleccionadas de la mutagénesis (EMS8, EMS9 y EMS23), se crecieron en solución nutritiva con 1,4 mM de  $K^+$  durante 28 días y seguidamente se cambiaron a una solución 1/5H con 0,5 mM  $K^+$  y 125  $\mu M$  de  $Cs^+$ , manteniéndose con este tratamiento durante 7 días. Transcurrido este tiempo, las plantas se separaron en parte aérea y raíz, se secaron y se determinó el peso seco de la parte aérea y la raíz. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

Las plantas se procesaron para determinar la concentración interna de  $K^+$  y  $Cs^+$ . En la concentración de  $K^+$  se observaron claras diferencias entre las líneas (Figura 62). La línea mutante EMS9 presentó una concentración de  $K^+$  tanto en la parte aérea como en la raíz superior a la del doble mutante *athak5akt1*, aunque menor que el genotipo silvestre. Por otro lado, la concentración de  $K^+$  de la línea EMS8 resultó similar a la del mutante *akt1athak5* en la parte aérea, e inferior a ésta en la raíz. Por último, las diferencias entre la línea EMS23 y *athak5akt1* no resultaron significativas.

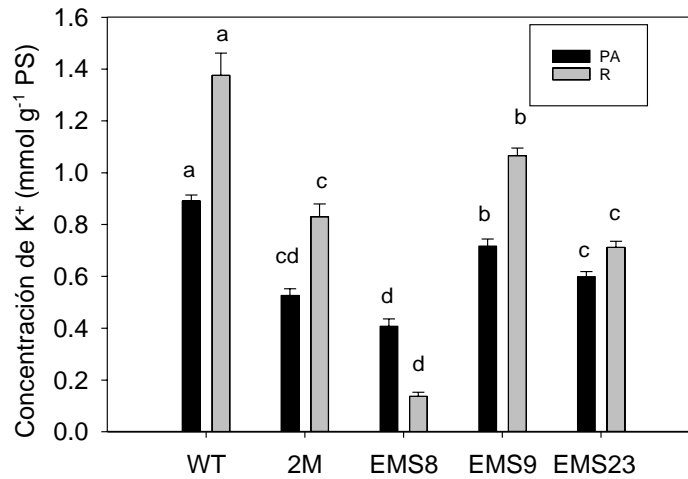


Figura 62. Concentración de K<sup>+</sup> de la parte aérea (barras negras) y de la raíz (barras grises) de distintas líneas de *Arabidopsis* crecidas en 0,5 mM de K<sup>+</sup> y 125 μM de Cs<sup>+</sup>. Plantas WT, *athak5akt1*(2M) y de las líneas seleccionadas de la mutagénesis (EMS8, EMS9 y EMS23), se cultivaron y trataron tal y como se indica en la Figura 61. Tras separar las plantas en parte aérea y raíz, se secaron y se realizó una digestión del material vegetal para determinar la concentración interna de K<sup>+</sup>. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey.

En la concentración de Cs<sup>+</sup> (Figura 63) de la parte aérea no se observaron diferencias significativas entre las líneas, presentando todas ellas valores cercanos a los 20 μmolgPS<sup>-1</sup> R. En cambio, en la raíz sí se observó claramente una mayor acumulación de Cs<sup>+</sup> del mutante *athak5akt1* con respecto al resto. Mientras que el genotipo silvestre y las líneas EMS9 y EMS23 presentaban concentraciones de Cs<sup>+</sup> entre 30 y 35 μmolgPS<sup>-1</sup> R, la concentración de este elemento en la raíz del mutante *akt1athak5* fue superior a 50 μmolgPS<sup>-1</sup> R. La línea que menor concentración de Cs<sup>+</sup> presentó en la raíz fue la mutante EMS8.

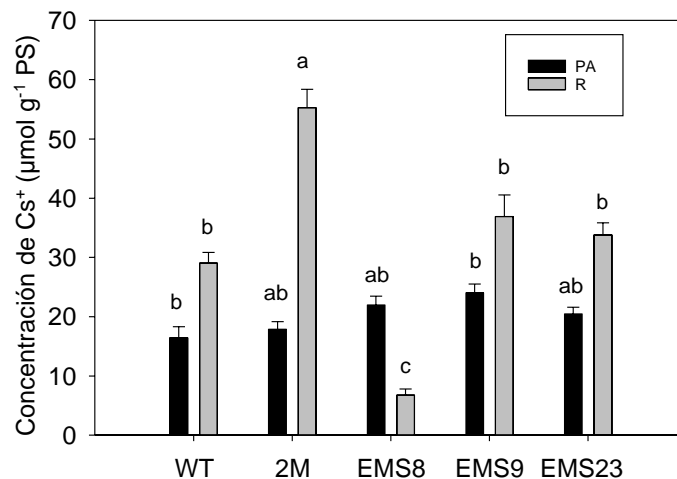


Figura 63. Concentración de  $\text{Cs}^+$  de la parte aérea (barras negras) y de la raíz (barras grises) de distintas líneas de *Arabidopsis* crecidas en 0,5 mM de  $\text{K}^+$  y 125  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cs}^+$ . Plantas WT, *athak5akt1*(2M) y de las líneas seleccionadas de la mutagénesis (EMS8, EMS9 y EMS23), se cultivaron y trataron tal y como se indica en la Figura 61. Tras separar las plantas en parte aérea y raíz, se secaron y se realizó una digestión del material vegetal para determinar la concentración interna de  $\text{Cs}^+$ . En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

Se calculó la entrada de  $\text{Cs}^+$  a partir la cantidad de  $\text{Cs}^+$  presente en el interior de la planta ( $\mu\text{mol}$ ) dividida por el peso seco de la raíz (g). En la entrada de  $\text{Cs}^+$  (Figura 64) se pudo observar que la línea mutante EMS8 presentaba valores similares a los del genotipo silvestre próximos a 60  $\mu\text{molgPS}^{-1}$  R, mientras que en las líneas EMS9 y EMS23 la entrada de  $\text{Cs}^+$  mostraba valores similares a los del mutante *athak5akt1* próximos a 100  $\mu\text{molgPS}^{-1}$  R.

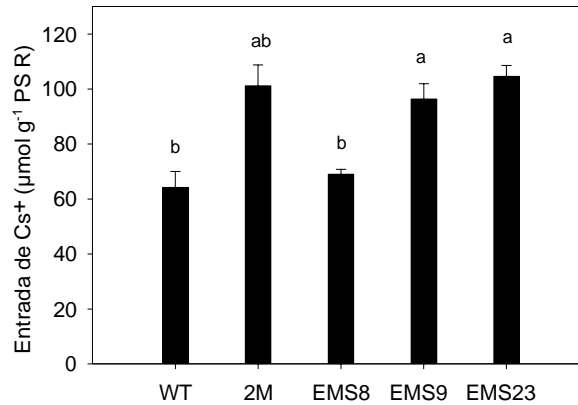


Figura 64. Entrada de Cs<sup>+</sup> en distintas líneas de *Arabidopsis* crecidas en 0,5 mM de K<sup>+</sup> y 125 µM de Cs<sup>+</sup>. Plantas WT, *athak5akt1*(2M) y de las líneas seleccionadas de la mutagénesis (EMS8, EMS9 y EMS23), se cultivaron y trataron tal y como se indica en la Figura 61. La entrada Cs<sup>+</sup> se calculó como la cantidad de Cs<sup>+</sup> presente en el interior de la planta (µmol) dividida por el peso seco de la raíz (g). En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a P<0,05 según el Test de Tukey.

Por último, en la relación Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (Figura 65) se pudo comprobar que ninguna de las líneas mutantes procedentes de la mutagénesis presentaba una relación Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en la parte aérea más favorable que el mutante *athak5akt1*. Sin embargo, en la raíz sí se observan diferencias significativas de las tres líneas mutantes con respecto a la raíz del genotipo *athak5akt1*. En todos los casos, la relación Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de las raíces de las plantas procedentes de la mutagénesis, resultó más favorable que en el mutante *athak5akt1*, aunque no llegaron al nivel del genotipo silvestre, a excepción de la línea EMS9, en la que las diferencias no resultaron estadísticamente significativas con las plantas silvestres.

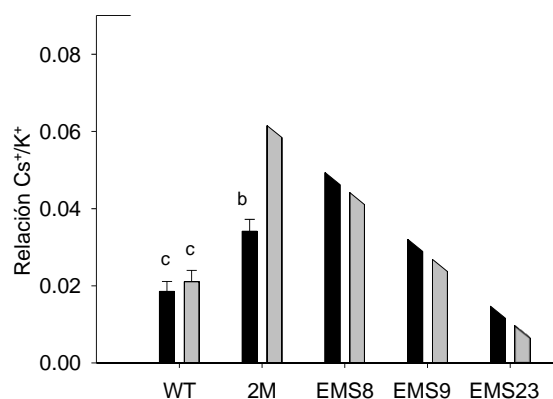


Figura 65. Relación  $Cs^+/K^+$  de la parte aérea (barras negras) y raíz (barras grises) de distintas líneas de *Arabidopsis* crecidas en 0,5 mM de  $K^+$  y 125  $\mu$ M de  $Cs^+$ . Plantas WT, *athak5akt1* (2M) y de las líneas seleccionadas de la mutagénesis (EMS8, EMS9 y EMS23), se cultivaron y trataron tal y como se indica en la Figura 61. Con los datos representados en las gráficas anteriores de la concentración de  $K^+$  y  $Cs^+$  de cada una de las líneas y para cada uno de los tratamientos, se calculó la relación  $Cs^+/K^+$  de parte aérea y raíz de las líneas estudiadas. En la figura se muestra la media de tres repeticiones independientes y las barras de error indican el error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas a  $P < 0,05$  según el Test de Tukey.

#### 4.3.6. Discusión

Como ya se ha mencionado anteriormente, los resultados obtenidos en el grupo de investigación, tras el estudio de la línea mutante de *Arabidopsis athak5akt1*, indican que existe un tercer sistema distinto de AtHAK5 y AKT1 implicado en la absorción de  $K^+$  en *Arabidopsis*. Este sistema de entrada de  $K^+$  es capaz de introducir suficiente  $K^+$  para permitir el desarrollo de la planta cuando la concentración de éste en el medio es suficientemente alta (Caballero et al., 2012). Se conoce que este sistema es sensible a  $Ca^{2+}$  y además transporta  $Cs^+$ , se regula por nucleótidos cíclicos y podría estar codificado por genes de las familias CNGC o GRL. Por otro lado, este sistema podría ser la principal vía de entrada de  $Na^+$  en la planta en condiciones de salinidad, lo cual resultaría de gran interés puesto que todavía no se ha identificado el sistema por el que el  $Na^+$  entra en la planta en estas condiciones de estrés. Por ello, la identificación de esta vía de entrada



resultaría clave para el diseño de nuevas estrategias que permitan la obtención de plantas más tolerantes a la salinidad. Una teoría sobre la vía de entrada de  $\text{Na}^+$  propone que ésta sería un canal no selectivo independiente de voltaje (Amtmann and Sanders, 1999), lo cual sería compatible con la teoría de que el  $\text{Na}^+$  entre por un sistema distinto AtHAK5 y AKT1. Para la identificación de este sistema, en esta Tesis Doctoral se planteó un abordaje por mutagénesis con EMS sobre la línea mutante de *Arabidopsis athak5akt1*. Tras la mutagénesis, se emplearon condiciones de selección que no resultaron extremadamente tóxicas, las cuales permitían el crecimiento de las plantas WT, pero no del mutante *athak5akt1* (Figura 54). Estas condiciones permitirían identificar mutantes que hubieran aumentado la selectividad  $\text{K}^+/\text{Cs}^+$  del tercer sistema de entrada de  $\text{K}^+$ , el cual estaría implicado también en la entrada de  $\text{Na}^+$ . En condiciones sin  $\text{Cs}^+$  las plantas *athak5akt1* se desarrollarían con normalidad, sin embargo, en presencia de  $\text{Cs}^+$  éste provocaría toxicidad en dicha línea, y una mutación que aumentara la selectividad  $\text{K}^+/\text{Cs}^+$  del mencionado tercer sistema de entrada de  $\text{K}^+$  permitiría el crecimiento de la planta.

En los experimentos preliminares realizados con las líneas WT y *athak5akt1*, se comprobó que la presencia de  $\text{Cs}^+$  en la solución de cultivo durante 7 días no tenía un efecto negativo directo sobre el crecimiento de las plantas cuando la concentración de  $\text{Cs}^+$  era inferior a 250  $\mu\text{M}$ . El peso seco de estas líneas (Figura 55) fue similar en todos los tratamientos a excepción del tratamiento con 1 mM de  $\text{K}^+$  +250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cs}^+$ , donde el tamaño de las plantas disminuyó aproximadamente un 30% en ambas líneas. Resultó interesante la diferencia existente entre ambas líneas en la relación  $\text{Cs}^+/\text{K}^+$ , especialmente en la raíz del mutante *athak5akt1* (Figura 59 B), en el que los valores en este órgano fueron altos y prácticamente no variaron entre los tratamientos ensayados. La relación  $\text{Cs}^+/\text{K}^+$  ya se ha relacionado con la toxicidad que presentan las plantas al  $\text{Cs}^+$  (Hampton et al., 2004), principalmente debido a la competencia entre  $\text{Cs}^+$  y  $\text{K}^+$  (Avery, 1995). Los resultados mostrados en esta Tesis están en concordancia con lo ya publicado en trabajos anteriores de otros grupos en los que se indica que un aumento de la concentración de  $\text{K}^+$  en el medio pueden revertir parcialmente los síntomas de toxicidad debidos a  $\text{Cs}^+$ .

El metanosulfonato de etilo (EMS) es un agente alquilante ampliamente empleado para introducir mutaciones puntuales aleatorias. En *Arabidopsis*, el

tratamiento con este agente provoca sustituciones de GC a AT con gran eficiencia. Estas propiedades, junto con la fácil manipulación que presenta, hacen que el EMS sea el mutágeno escogido para llevar a cabo el proceso de la mutagénesis de las semillas de la línea *athak5akt1*.

De las pruebas realizadas ensayando distintas concentraciones de EMS y tiempo de exposición al mutágeno, se utilizaron las semillas de los tratamientos con 0,2% y 0,4% de EMS para continuar con los siguientes pasos del proceso de selección de plantas mutantes (Tabla 27). Ambas condiciones cumplían con las condiciones propuestas por distintos autores, que recomiendan un porcentaje de supervivencia de las plantas M1 próximo al 50% para que el proceso de mutagénesis resulte exitoso.

Se seleccionaron 8 líneas tolerantes a  $\text{Cs}^+$  y 2 a  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabla 28), empleando para la selección de las primeras 1/5H suplementado con 0,5 mM de  $\text{K}^+$  y 125  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cs}^+$ , y para las segundas 1/5H sin  $\text{K}^+$  y 20 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . De todas estas líneas se seleccionaron las que mejor crecimiento mostraron en el medio selectivo en la M2 para continuar con la caracterización fisiológica de las mismas, por lo que se empezó a trabajar con las líneas EMS8, EMS9 y EMS23.

Los primeros experimentos llevados a cabo para la caracterización de las líneas mutantes obtenidas consistieron en la realización de experimentos de acumulación de  $\text{Cs}^+$  en plantas cultivadas en sistema hidropónico, realizándose el experimento del mismo modo que en los ensayos preliminares con las líneas WT y *athak5akt1* del punto 4.3.2. Tras el análisis de los resultados obtenidos de dichos experimentos, se pudo observar que la línea EMS9 presentaba una concentración de  $\text{K}^+$  superior a la del mutante *athak5akt1*, pero inferior a la de WT (Figura 62), tanto en la parte aérea como en la raíz. En cuanto a la concentración de  $\text{Cs}^+$  en la parte aérea (Figura 56 A), no existen diferencias entre las líneas control y los mutantes estudiados. Sin embargo, en la raíz, las líneas EMS9 y EMS23, presentan una concentración de  $\text{Cs}^+$  similar a la de la línea WT e inferior a la del genotipo *athak5akt1*. Resulta llamativo el valor de la concentración de este elemento de la línea EMS8, siendo aproximadamente un 30% inferior a la del genotipo silvestre y un 85% a la del mutante *athak5akt1*.

Se calculó la entrada de  $\text{Cs}^+$  expresada en  $\mu\text{molgPS}^{-1} \text{R}$ , y en este caso, se observó que la única línea que presentaba una entrada de  $\text{Cs}^+$  similar a la del

genotipo silvestre fue la EMS8. Las otras dos líneas presentaron valores similares a los del genotipo *athak5akt1*.

Teniendo en cuenta todo lo dicho, la línea EMS8 parece tener mutado algún otro sistema de entrada de  $K^+$  que da lugar a una menor concentración de  $K^+$  (Figura 62) y de  $Cs^+$  (Figura 63) en el interior de la planta, resultando muy llamativas dichas concentraciones en comparación con las que presentaban las líneas control. Sin embargo, el tamaño de la misma se vio afectado negativamente respecto al genotipo silvestre (Figura 61). Aunque este resultado dista de los objetivos iniciales de la mutagénesis, en los que se buscaba obtener una planta tolerante a  $Cs^+$  que presentara un fenotipo similar al de las plantas WT, este puede ser un buen punto de partida para la identificación del tercer sistema de entrada de  $K^+$  en plantas.

Por otro lado, los resultados obtenidos con las líneas EMS9 y EMS23 también resultaron interesantes. En primer lugar, la raíz de ambas líneas presentó una concentración de  $Cs^+$  menor que el mutante *athak5akt1*, con valores similares a los de las plantas WT (Figura 63). Además de esto, la línea EMS9, presentaba una concentración de  $K^+$  en la raíz superior a la del mutante *athak5akt1*, aunque inferior a la del genotipo silvestre, lo cual podría estar indicando una mayor capacidad de discriminación entre  $K^+$  y  $Cs^+$ .

Estos resultados son el punto de partida de un proyecto a largo plazo, por lo que es necesario continuar con la caracterización de estas líneas y el resto de las obtenidas en la mutagénesis. Una vez caracterizadas más en profundidad, mediante la realización de distintos experimentos de absorción y la aplicación de técnicas de electrofisiología, el siguiente paso consistiría en asegurar que el fenotipo observado en las líneas mutantes de EMS es debido a mutaciones en sistemas implicados en la absorción de  $K^+$  y no en otros genes que no se encuentran relacionados con nuestro estudio. Sería necesario realizar sucesivos retrocruzamientos con el genotipo *athak5akt1* con el fin de recuperar al máximo el fondo genético de dicho mutante y eliminar otras mutaciones generadas en el proceso de mutagénesis que no estuvieran relacionadas con el proceso bajo estudio. Posteriormente, mediante la secuenciación del genoma de la planta mutante, podría determinarse la mutación que ha tenido lugar y que da lugar al fenotipo observado. Si esta mutación afecta un gen que determina un sistema de

transporte o algún regulador del mismo, podría llegar a identificarse la ruta de entrada de  $K^+$  en el mutante *athak5akt1*, que podría también ser la principal vía de entrada de  $Na^+$  en las plantas en condiciones de salinidad.

## **V - CONCLUSIONES**



## V - CONCLUSIONES

1. La absorción de  $K^+$  por la raíz de Arabidopsis se encuentra regulada por las proteínas quinasas AtCIPK1 y AtCIPK9.
2. La quinasa AtCIPK1 produce la activación de AtHAK5 en condiciones de bajo  $K^+$  tanto con el sensor de  $Ca^{2+}$  AtCBL1 como con AtCBL9.
3. La quinasa AtCIPK9 produce activación de AtHAK5 en condiciones de bajo  $K^+$  con el sensor de  $Ca^{2+}$  AtCBL1 pero no con AtCBL9.
4. La regulación del transportador de  $K^+$  no parece estar relacionada con el papel de la quinasa AtCIPK1 en la tolerancia al estrés osmótico.
5. El transportador SIHAK5 es el principal responsable de la absorción de  $K^+$  y  $Cs^+$  en el rango de alta afinidad en plantas de tomate.
6. El transportador SIHAK5 resulta imprescindible para permitir el crecimiento de la planta de tomate en condiciones de salinidad, y se requiere para mantener unos niveles mínimos de  $K^+$  en el interior de la célula.
7. La ausencia de un transportador SIHAK5 funcional (planta mutante *slhak5*) da lugar a una disminución de la fertilidad de la planta de tomate, produciendo frutos partenocárpicos. Esta menor fertilidad es debida a la disminución del porcentaje de germinación de los granos de polen y a una menor longitud de los tubos polínicos en las plantas *slkak5*.
8. La mutagénesis con EMS del mutante de Arabidopsis *akt1athak5* ha permitido la obtención de líneas mutantes con una mayor tolerancia al  $Cs^+$ . El estudio más en profundidad de estas líneas permitirá conocer qué

mutación es responsable de este aumento de la tolerancia a la presencia de  $\text{Cs}^+$  en el medio.



## **VI - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## VI – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aktas H, Karni L, Chang DC, Turhan E, Bar-Tal A, Aloni B** (2005) The suppression of salinity-associated oxygen radicals production, in pepper (*Capsicum annuum*) fruit, by manganese, zinc and calcium in relation to its sensitivity to blossom-end rot. *Physiol Plant* **123**: 67-74
- Aleman F, Caballero F, Ródenas R, Rivero RM, Martínez V, Rubio F** (2014) The F130S point mutation in the Arabidopsis high-affinity K<sup>+</sup> transporter AtHAK5 increases K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> selectivity and confers Na<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> tolerance to yeast under heterologous expression. *Frontiers in Plant Science* **5**
- 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**: 1603-1612
- Amtmann A, Armengaud P, Volkov V, Michael RB** (2004) Potassium nutrition and salt stress. *In* Membrane transport in plants. Blackwell, Oxford, pp 293-339
- Amtmann A, Blatt MR** (2009) Regulation of macronutrient transport. *New Phytologist* **181**: 35-52
- Amtmann A, Sanders D** (1999) Mechanisms of Na<sup>+</sup> uptake by plant cells. *Adv Bot Res* **29**: 75-112
- Amtmann A, Troufflard S, Armengaud P** (2008) The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiol Plant* **133**: 682-691
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399
- 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

- Avery SV** (1995) Caesium accumulation by microorganisms: uptake mechanisms, cation competition, compartmentalization and toxicity. *J Ind Microbiol* **14**: 76-84
- Balagué C, Lin B, Alcon C, Flottes G, Malmström S, Köhler C, Neuhaus G, Pelletier G, Gaymard F, Roby D** (2003) HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* **15**: 365-379
- Bañuelos MA, Garcíadeblas B, Cubero B, Rodríguez-Navarro A** (2002) Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol* **130**: 784-795
- Bañuelos MA, Quintero FJ, Rodríguez-Navarro A** (1995) Functional expression of the ENA1(PMR2)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* **1229**: 233-238
- Behera S, Long Y, Schmitz-Thom I, Wang X-P, Zhang C, Li H, Steinhorst L, Manishankar P, Ren X-L, Offenborn JN, Wu W-H, Kudla J, Wang Y** (2017) Two spatially and temporally distinct Ca<sup>2+</sup> signals convey *Arabidopsis thaliana* responses to K<sup>+</sup> deficiency. *New Phytologist* **213**: 727-738
- Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E** (2015) The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *genom* **53**: 474-485
- Brett CL, Donowitz M, Rao R** (2005) Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C223-239
- Broadley M, Escobar Gutierrez A, Bowen H, Willey N, White P** (2001) Influx and accumulation of Cs<sup>+</sup> by the akt1 mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. lacking a dominant K<sup>+</sup> transport system. *Journal of Experimental Botany* **52**: 839-844
- Brunelli JP, Pall ML** (1993) A Series of Yeast Shuttle Vectors for Expression of Cdnas and Other Dna-Sequences. *Yeast* **9**: 1299-1308
- Burger A, Lichtscheidl I** (2018) Stable and radioactive cesium: A review about distribution in the environment, uptake and translocation in plants, plant reactions and plants' potential for bioremediation. *Science of The Total Environment* **618**: 1459-1485
- Bush DS** (1995) Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 95-122

- Caballero F, Botella MA, Rubio L, Fernández JA, 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
- Calvo-Polanco M, Sánchez-Romera B, Aroca R, Asins MJ, Declerck S, Dodd IC, Martínez-Andújar C, Albacete A, Ruiz-Lozano JM** (2016) Exploring the use of recombinant inbred lines in combination with beneficial microbial inoculants (AM fungus and PGPR) to improve drought stress tolerance in tomato. *Environmental and Experimental Botany* **131**: 47-57
- Cellier F, Conéjéro G, Ricaud L, Luu DT, Lepetit M, Gosti F, Casse F** (2004) Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from Arabidopsis thaliana suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *The plant journal* **39**: 834-846
- Colmer TD, Flowers TJ, Munns R** (2006) Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1059-1078
- Collander R** (1941) Selective absorption of cations by higher plants. *Plant Physiology* **16**: 691-720
- Corratgé-Faillie C, Jabnour M, Zimmermann S, Véry AA, Fizames C, Sentenac H** (2010) Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 2511-2532
- Costa A, Kudla J** (2015) Colorful insights: advances in imaging drive novel breakthroughs in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Molecular plant* **8**: 352-355
- Cuin TA, Miller AJ, Laurie SA, Leigh RA** (2003) Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany* **54**: 657-661
- Chen G, Hu Q, Luo L, Yang T, Zhang S, Hu Y, Yu L, Xu G** (2015) Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant Cell Environ* **38**: 2747-2765
- Chen G, Zhang Y, Ruan B, Guo L, Zeng D, Gao Z, Zhu L, Hu J, Ren D, Yu L, Xu G, Qian Q** (2018) OsHAK1 controls the vegetative growth and panicle fertility of rice by its effect on potassium-mediated sugar metabolism. *Plant Science* **274**: 261-270
- 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. *Plant J* **52**: 223-239

- Christopher D, Borsics T, Yuen C, Ullmer W, Andeme-Ondzighi C, Andres M, Kang B, Staehelin L** (2007) The cyclic nucleotide gated cation channel AtCNGC10 traffics from the ER via Golgi vesicles to the plasma membrane of Arabidopsis root and leaf cells. *BMC Plant Biol* **7**: 48
- D'Angelo C, Weinl S, Batistic O, Pandey GK, Cheong YH, Schültke S, Albrecht V, Ehlert B, Schulz B, Harter K, Luan S, Bock R, Kudla J** (2006) Alternative complex formation of the Ca<sup>2+</sup>-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis. *The Plant Journal* **48**: 857-872
- Das R, Pandey GK** (2010) Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling. *Current genomics* **11**: 2-13
- Davenport R, James RA, Zakrisson-Plogander A, Tester M, Munns R** (2005) Control of Sodium Transport in Durum Wheat. *Plant Physiology* **137**: 807-818
- Demidchik V** (2004) Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of Arabidopsis root cells. *Planta* **219**: 167
- Demidchik V, Davenport RJ, Tester M** (2002) Nonselective cation channels in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 67-107
- 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
- Demidchik V, Tester M** (2002) Sodium Fluxes through Nonselective Cation Channels in the Plasma Membrane of Protoplasts from Arabidopsis Roots. *Plant Physiol* **128**: 379-387
- Dietrich P, Anschutz U, Kugler A, Becker D** (2010) Physiology and biophysics of plant ligand-gated ion channels. *Plant Biology* **12**: 80-93
- Dubeaux G, Neveu J, Zelazny E, Vert G** (2018) Metal Sensing by the IRT1 Transporter-Receptor Orchestrates Its Own Degradation and Plant Metal Nutrition. *Mol Cell* **69**: 953-964.e955
- Edwards AN, Patterson-Fortin LM, Vakulskas CA, Mercante JW, Potrykus K, Vinella D, Camacho MI, Fields JA, Thompson SA, Georgellis D, Cashel M, Babitzke P, Romeo T** (2011) Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Molecular Microbiology* **80**: 1561-1580
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**: 1349-1349

- Elble R** (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**: 18-20
- 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
- Evans AR, Hall D, Pritchard J, Newbury HJ** (2012) The roles of the cation transporters CHX21 and CHX23 in the development of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* **63**: 59-67
- Fan LM, Wang YF, Wang H, Wu WH** (2001) In vitro *Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts. *J Exp Bot* **52**: 1603-1614
- Forde BG, Lea PJ** (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2339-2358
- Franceschinelli EV, Silva Neto CM, Lima FG, Gonçalves BB, Bergamini LL, Bergamini BAR, Elias MA** (2013) Native bees pollinate tomato flowers and increase fruit production. 2013 **11**
- Frederick M. Ausubel RB, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, y Struhl, K.** (1989) Current protocols in molecular biology, edited by M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, 1988, \$165.00. *Molecular Reproduction and Development* **1**: 146-146
- Fu HH, Luan S** (1998) AtKuP1: a dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 63-73
- Fujimura S, Yoshioka K, Ota T, Ishikawa T, Sato M, Satou M** (2016) The inhibitory effects of potassium chloride versus potassium silicate application on <sup>137</sup>Cs uptake by rice. *J Environ Radioact* **153**: 188-194
- Fujiwara T** (2013) Cesium Uptake in Rice: Possible Transporter, Distribution, and Variation. *In* Nakanishi T.M., T K., eds, *Agricultural Implications of the Fukushima Nuclear Accident*. Springer, Tokyo
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA** (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, Thibaud JB** (1996) The Baculovirus/Insect Cell System as an Alternative to *Xenopus* Oocytes. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 22863-22870
- Genies L, Orjollet D, Carasco L, Camilleri V, Frelon S, Vavasseur A, Leonhardt N, Henner P** (2017) Uptake and translocation of cesium by *Arabidopsis thaliana* in hydroponics conditions: Links between kinetics and molecular mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* **138**: 164-172
- Gibeaut DM, Hulett J, Cramer GR, Seemann JR** (1997) Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiology* **115**: 317-319
- Gierth M, Maser P** (2007) Potassium transporters in plants - Involvement in K<sup>+</sup> acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters* **581**: 2348-2356
- 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**: 1105-1114
- Gobert A, Park G, Amtmann A, Sanders D, Maathuis FJM** (2006) *Arabidopsis thaliana* Cyclic Nucleotide Gated Channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *Journal of Experimental Botany* **57**: 791-800
- Gorham J, Bristol A, Young EM, Wyn Jones RG** (1991) The presence of the enhanced K/Na discrimination trait in diploid *Triticum* species. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **82**: 729-236
- Grini PE, Schnittger A, Schwarz H, Zimmermann I, Schwab B, Jürgens G, Hülskamp M** (1999) Isolation of ethyl methanesulfonate-induced gametophytic mutants in *Arabidopsis thaliana* by a segregation distortion assay using the multimarker chromosome 1. *Genetics* **151**: 849-863
- Guo K, Babourina O, Christopher D, Borsics T, Rengel Z** (2008) The cyclic nucleotide-gated channel, AtCNGC10, influences salt tolerance in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* **134**: 499 - 507
- Guo KM, Babourina O, Christopher DA, Borsic T, Rengel Z** (2010) The cyclic nucleotide-gated channel AtCNGC10 transports Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* **139**: 303-312



- Hampton CR, Bowen HC, Broadley MR, Hammond JP, Mead A, Payne KA, Pritchard J, White PJ** (2004) Cesium Toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiology* **136**: 3824-3837
- Han M, Wu W, Wu W-H, Wang Y** (2016) Potassium Transporter KUP7 Is Involved in K<sup>+</sup> Acquisition and Translocation in Arabidopsis Root under K<sup>+</sup> Limited Conditions. *Molecular Plant*
- Hanks SK, Hunter T** (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal* **9**: 576-596
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF** (2000) CDPKs a kinase for every Ca<sup>2+</sup> signal? *Trends Plant Sci* **5**: 154-159
- Haro R, Banuelos MA, Rodriguez-Navarro A** (2010) High-affinity sodium uptake in land plants. *Plant and Cell Physiology* **51**: 68-79
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 463-499
- Hashimoto K, Eckert C, Anschutz U, Scholz M, Held K, Waadt R, Reyer A, Hippler M, Becker D, Kudla J** (2012) Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. *J Biol Chem* **287**: 7956-7968
- HAUSER F, HORIE T** (2010) A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratio in leaves during salinity stress. *Plant, cell & environment* **33**: 552-565
- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR** (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**: 918-921
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF** (2009) CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* **138**: 1184-1194
- Hoagland DR, Arnon DI** (1950) The water culture method for growing plants without soil. *Cir.Calif.Agric.Exp.Stn.Berkeley, USA* **347**: 1-32
- Hodge A** (2004) The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**: 9-24

- Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, Leung HY, Miyao A, Hirochika H, An G, Schroeder JI** (2007) Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. *Embo Journal* **26**: 3003-3014
- Horie T, Hauser F, Schroeder JI** (2009) HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in Plant Science* **14**: 660-668
- Jander G, Baerson SR, Hudak JA, Gonzalez KA, Gruys KJ, Last RL** (2003) Ethylmethanesulfonate Saturation Mutagenesis in Arabidopsis to Determine Frequency of Herbicide Resistance. *Plant Physiology* **131**: 139-146
- 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, Zhang F-S** (2009) Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 3041-3046
- Jung JY, Shin R, Schachtman DP** (2009) Ethylene Mediates Response and Tolerance to Potassium Deprivation in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**: 607-621
- Kaddour R, Narsi N, Mirah S, Berthomieu P, Lachaal M** (2009) Comparative effect of potassium on K and Na uptake and transport in two accessions of Arabidopsis thaliana during salinity stress. *Comptes rendus.Biologies* **332**: 784-794
- Kanter U, Hauser A, Michalke B, Dräxl S, Schäffner AR** (2010) Caesium and strontium accumulation in shoots of Arabidopsis thaliana: genetic and physiological aspects. *Journal of Experimental Botany*
- Kaplan B, Sherman T, Fromm H** (2007) Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters* **581**: 2237-2246
- Karley AJ, White PJ** (2009) Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 291-298
- Kim EJ, Kwak JM, Uozumi N, Schroeder JI** (1998) AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* **10**: 51-62
- Kim Y, Schumaker K, Zhu J-K** (2006) EMS Mutagenesis of Arabidopsis. *In* J Salinas, J Sanchez-Serrano, eds, *Arabidopsis Protocols*, Vol 323. Humana Press, pp 101-103
- Kobayashi D, Uozumi N, Hisamatsu Si, Yamagami M** (2010) AtKUP/HAK/KT9, a K<sup>+</sup> transporter from Arabidopsis thaliana, mediates Cs<sup>+</sup> uptake in Escherichia coli. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **74**: 203-205

- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K** (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* **22**: 541-563
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S** (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4718-4723
- Laohavisit A, Shang Z, Rubio L, Cuin TA, Very AA, Wang A, Mortimer JC, Macpherson N, Coxon KM, Battey NH, Brownlee C, Park OK, Sentenac H, Shabala S, Webb AA, Davies JM** (2012) Arabidopsis annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> permeable conductance in root cells. *Plant Cell* **24**: 1522-1533
- Lebaudy A, Very AA, Sentenac H** (2007) K<sup>+</sup> channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters* **581**: 2357-2366
- 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**: 15959-15964
- Leigh RA, Wyn Jones RG** (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
- Lepage H, Evrard O, Onda Y, Lefevre I, Lacey JP, Ayrault S** (2015) Depth distribution of cesium-137 in paddy fields across the Fukushima pollution plume in 2013. *J Environ Radioact* **147**: 157-164
- Lepage H, Evrard O, Onda Y, Lefèvre I, Lacey JP, Ayrault S** (2015) Depth distribution of cesium-137 in paddy fields across the Fukushima pollution plume in 2013. *J Environ Radioact* **147**: 157-164
- 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
- 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**: 643-653
- Liu J, Zhu JK** (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* **280**: 1943-1945
- Liu L-L, Ren H-M, Chen L-Q, Wang Y, Wu W-H** (2013) A Protein Kinase, Calcineurin B-Like Protein-Interacting Protein Kinase9, Interacts with Calcium Sensor Calcineurin B-Like Protein3 and Regulates Potassium

- Homeostasis under Low-Potassium Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology* **161**: 266-277
- Liu LL, Ren HM, Chen LQ, Wang Y, Wu WH** (2013) A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein Kinase9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like Protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in Arabidopsis. *Plant Physiol* **161**: 266-277
- Luan S** (2009) The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci* **14**: 37-42
- Maathuis FJ, Sanders D** (1994) Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 9272-9276
- Maathuis FJM** (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 250-258
- Maathuis FJM, Amtmann A** (1999) K<sup>+</sup> Nutrition and Na<sup>+</sup> Toxicity: The Basis of Cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> Ratios. *Annals of Botany* **84**: 123-133
- Maathuis FJM, Filatov V, Herzyk P, Krijger GC, Axelsen KB, Chen SX, 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 J* **35**: 675-692
- Maathuis FJM, Sanders D** (1993) Energization of potassium uptake 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
- Mähs A, Steinhorst L, Han J-P, Shen L-K, Wang Y, Kudla J** (2013) The Calcineurin B-like Ca<sup>2+</sup> sensors CBL1 and CBL9 function in pollen germination and pollen tube growth in Arabidopsis. *Molecular Plant*
- Maisonneuve B, Den Nijs APM** (1984) In vitro pollen germination and tube growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and its relation with plant growth. *Euphytica* **33**: 833-840
- Maple J, Møller S** (2007) Mutagenesis in Arabidopsis. *In* E Rosato, ed, *Circadian Rhythms*, Vol 362. Humana Press, pp 197-206
- Marschner H** (1995) Mineral nutrition of higher plants. Springer, New York
- Marschner P** (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition). Academic Press, San Diego

- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML** (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 1646-1667
- McAinsh MR, Hetherington AM** (1998) Encoding specificity in Ca<sup>2+</sup> signalling systems. *Trends in Plant Science* **3**: 32-36
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A** (1997) A new model system for tomato genetics. *Plant Journal* **12**: 1465-1472
- Meyerowitz EM** (2001) Prehistory and History of Arabidopsis Research. *Plant Physiology* **125**: 15-19
- Michard E, Simon AA, Tavares B, Wudick MM, Feijó JA** (2017) Signaling with Ions: The Keystone for Apical Cell Growth and Morphogenesis in Pollen Tubes. *Plant Physiology* **173**: 91-111
- Mumberg D, Müller R, Funk M** (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122
- Munns R, Gilliam M** (2015) Salinity tolerance of crops - what is the cost? *New Phytol* **208**: 668-673
- Munns R, Tester M** (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651-681
- Nagao S, Kanamori M, Ochiai S, Tomihara S, Fukushi K, Yamamoto M** (2013) Export of <sup>134</sup>Cs and <sup>137</sup>Cs in the Fukushima river systems at heavy rains by Typhoon Roke in September 2011. *Biogeosciences* **10**: 6215-6223
- Nieves-Cordones M, Aleman F, Martinez V, Rubio F** (2010) The Arabidopsis thaliana HAK5 K<sup>+</sup> Transporter Is Required for Plant Growth and K<sup>+</sup> Acquisition from Low K<sup>+</sup> Solutions under Saline Conditions. *Mol Plant* **3**: 326-333
- Nieves-Cordones M, Lara A, Ródenas R, Amo J, Rivero RM, Martínez V, Rubio F** (2019) Modulation of K<sup>+</sup> translocation by AKT1 and AtHAK5 in Arabidopsis plants. *Plant, Cell & Environment* **0**
- Nieves-Cordones M, Martínez V, Benito B, Rubio F** (2016) Comparison between Arabidopsis and Rice for Main Pathways of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> Uptake by Roots. *Frontiers in Plant Science* **7**

- 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**: 521-532
- Nieves-Cordones M, Mohamed S, Tanoi K, Kobayashi NI, Takagi K, Vernet A, Guiderdoni E, Perin C, Sentenac H, Very AA** (2017) Production of low-Cs<sup>+</sup> rice plants by inactivation of the K<sup>+</sup> transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. *Plant J* **92**: 43-56
- Nieves-Cordones M, Rodenas R, Chavanieu A, Rivero RM, Martinez V, Gaillard I, Rubio F** (2016) Uneven HAK/KUP/KT protein diversity among angiosperms: species distribution and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **7**
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM** (1995) Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiology* **109**: 735-742
- Ohmori Y, Kajikawa M, Nishida S, Tanaka N, Kobayashi NI, Tanoi K, Furukawa J, Fujiwara T** (2014) The effect of fertilization on cesium concentration of rice grown in a paddy field in Fukushima Prefecture in 2011 and 2012. *J Plant Res* **127**: 67-71
- Pandey G, Kanwar P, Pandey A** (2014) *Global Comparative Analysis of CBL-CIPK Gene Families in Plants*. Springer International Publishing
- Pandey GK, Cheong YH, Kim BG, Grant JJ, Li LG, Luan S** (2007) CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in Arabidopsis. *Cell Research* **17**: 411-421
- Pasternak D** (1987) Salt Tolerance and Crop Production - A Comprehensive Approach. *Annual Review of Phytopathology* **25**: 271-291
- 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, 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**: 863-875
- Qi Z, Hampton CR, Shin R, Barkla BJ, White PJ, Schachtman DP** (2008) The high affinity K<sup>+</sup> 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 FJ, Blatt MR** (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 RM, Martinez V, Pardo JM, Quintero FJ, Rubio F** (2015) The CBL-Interacting Protein Kinase CIPK23 Regulates HAK5-Mediated High-Affinity  $K^+$  Uptake in Arabidopsis Roots. *Plant Physiol* **169**: 2863-2873
- Rai H, Yokoyama S, Satoh-Nagasawa N, Furukawa J, Nomi T, Ito Y, Fujimura S, Takahashi H, Suzuki R, Yousra E, Goto A, Fuji S, Nakamura S-i, Shinano T, Nagasawa N, Wabiko H, Hattori H** (2017) Cesium Uptake by Rice Roots Largely Depends Upon a Single Gene, HAK1, Which Encodes a Potassium Transporter. *Plant and Cell Physiology* **58**: 1486-1493
- Reddy ASN** (2001) Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Science* **160**: 381-404
- Reintanz B, Szyroki A, Ivashikina N, Ache P, Godde M, Becker D, Palme K, Hedrich R** (2002) AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel alpha - subunit modulates root hair  $K^+$  influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 4079-4084
- Rengasamy P** (2010) Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology* **37**: 613-620
- Rengel Z, Damon PM** (2008) Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. *Physiol Plant* **133**: 624-636
- Rentsch D, Laloi M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot S, Frommer WB** (1995) NTr1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in Arabidopsis. *FEBS Lett* **370**: 264-268
- Rodenas R** (2019) Estudio de la regulación de los sistemas implicados en la absorción y translocación de potasio en Arabidopsis thaliana L. y Solanum lycopersicum L. Doctoral Thesis. Universidad de Murcia, Murcia
- Rodenas R, Nieves-Cordones M, Rivero RM, Martinez V, Rubio F** (2018) Pharmacological and gene regulation properties point to the SIHAK5  $K^+$  transporter as a system for high-affinity  $Cs^+$  uptake in tomato plants. *Physiol Plant* **162**: 455-466
- Rodríguez-Navarro A** (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 1-30
- Rodríguez-Navarro A, Ramos J** (1984) Dual system for potassium transport in Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* **159**: 940-945

- Rubio F, Alemán F, Nieves-Cordones M, Martínez V** (2010) Studies on Arabidopsis *athak5*, *atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K<sup>+</sup> uptake. *Physiol Plant* **139**: 220-228
- Rubio F, Arévalo L, Caballero F, Botella MA, Rubio JS, García-Sánchez F, Martínez V** (2010) Systems involved in K<sup>+</sup> uptake from diluted solutions in pepper plants as revealed by the use of specific inhibitors. *J Plant Physiol* **167**: 1494-1499
- 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 F, Nieves-Cordones M, Horie T, Shabala S** (2019) Doing 'business as usual' comes with a cost: evaluating energy cost of maintaining plant intracellular K<sup>+</sup> homeostasis under saline conditions. *New Phytologist* **0**
- Rubio F, Santa-Maria GE, Rodríguez-Navarro A** (2000) Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol Plant* **109**: 34-43
- Rubio JS, Garcia-Sanchez F, Rubio F, Garcial AL, Martínez V** (2010) The importance of K<sup>+</sup> in ameliorating the negative effects of salt stress on the growth of pepper plants. *European Journal of Horticultural Sciences* **75**: 33-41
- Sakai M, Gomi T, Nunokawa M, Wakahara T, Onda Y** (2014) Soil removal as a decontamination practice and radiocesium accumulation in tadpoles in rice paddies at Fukushima. *Environ Pollut* **187**: 112-115
- Sambrook J, Russell DW** (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sánchez-Barrena MJ, Fujii H, Angulo I, Martínez-Ripoll M, Zhu J-K, Albert A** (2007) The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Molecular cell* **26**: 427-435
- Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Albert A** (2013) Structural Biology of a Major Signaling Network that Regulates Plant Abiotic Stress: The CBL-CIPK Mediated Pathway. *International journal of molecular sciences* **14**: 5734-5749
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF** (1999) Communicating with Calcium. *Plant Cell* **11**: 691-706



- Santa-María GE, Rubio F, Dubcovsky J, Rodriguez-Navarro A** (1997) The HAK1 Gene of Barley is a Member of a Large Gene Family and Encodes a High-Affinity Potassium Transporter. *Plant Cell* **9**: 2281-2289
- Schachtman DP, Schroeder JI, Lucas WJ, Anderson JA, Gaber RF** (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* **258**: 1654-1658
- Scherzer S, Bohm J, Krol E, Shabala L, Kreuzer I, Larisch C, Bemm F, Al-Rasheid KA, Shabala S, Rennenberg H, Neher E, Hedrich R** (2015) Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 7309-7314
- 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
- Serrano R, Rodriguez-Navarro A** (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 399-404
- Shabala S, Cuin TA** (2008) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant* **133**: 651-669
- Shen M, Yen A** (2009) c-Cbl tyrosine kinase-binding domain mutant G306E abolishes the interaction of c-Cbl with CD38 and fails to promote retinoic acid-induced cell differentiation and G0 arrest. *J Biol Chem* **284**: 25664-25677
- Sherman F** (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **194**: 3-21
- Shin R, Schachtman DP** (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
- Singh A, Yadav AK, Kaur K, Sanyal SK, Jha SK, Fernandes JL, Sharma P, Tokas I, Pandey A, Luan S, Pandey GK** (2018) A protein phosphatase 2C, AP2C1, interacts with and negatively regulates the function of CIPK9 under potassium-deficient conditions in Arabidopsis. *J Exp Bot* **69**: 4003-4015
- Spalding EP, Hirsch RE, Lewis DR, Qi Z, Sussman MR, Lewis BD** (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
- Srivastava A, Handa AK** (2005) Hormonal Regulation of Tomato Fruit Development: A Molecular Perspective. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**: 67-82

- Straub T, Ludewig U, Neuhauser B** (2017) The Kinase CIPK23 Inhibits Ammonium Transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **29**: 409-422
- Swarbreck S, Colaco R, Davies J** (2013) Plant calcium-permeable channels. *Plant Physiology*
- Taiz LaZ, Eduardo Zeiger** (2006) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc
- Tapken D, Hollmann M** (2008) *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *J Mol Biol* **383**: 36-48
- Tavakkoli E, Fatehi F, Coventry S, Rengasamy P, McDonald GK** (2011) Additive effects of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions on barley growth under salinity stress. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2189-2203
- Tian Q, Zhang X, Yang A, Wang T, Zhang W-H** (2016) CIPK23 is involved in iron acquisition of *Arabidopsis* by affecting ferric chelate reductase activity. *Plant Science* **246**: 70-79
- Vallejo AJ** (2005) Expression of potassium-transporter coding genes, and kinetics of rubidium uptake, along a longitudinal root axis. *Plant, cell & environment* **28**: 850-862
- Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P** (2000) Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends Biotechnol* **18**: 233-242
- Venema K, Quintero FJ, Pardo JM, Donaire JP** (2002) The *Arabidopsis* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>Exchanger AtNHX1 Catalyzes Low Affinity Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> Transport in Reconstituted Liposomes. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 2413-2418
- 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**: 575-603
- Wakabayashi S, Itoh S, Kihou N, Matsunami H, Hachinohe M, Hamamatsu S, Takahashi S** (2016) Influence of water management and fertilizer application on <sup>137</sup>Cs and <sup>133</sup>Cs uptake in paddy rice fields. *J Environ Radioact* **157**: 102-112
- Weinl S, Kudla J** (2009) The CBL–CIPK Ca<sup>2+</sup> decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist* **184**: 517-528
- Weisenseel MH, Jaffe LF** (1976) The major growth current through lily pollen tubes enters as K<sup>+</sup> and leaves as H<sup>+</sup>. *Planta* **133**: 1-7

- White PJ** (1997) Cation channels in the plasma membrane of rye roots. *Journal of Experimental Botany* **48**: 499-514
- White PJ, Broadley MR** (2000) Mechanisms of caesium uptake by plants. *New Phytologist* **147**: 241-256
- White PJ, Karley AJ** (2010) Potassium. *In* RMRR Hell, ed, *Cell Biology of Metals and Nutrients*, Vol 17. Springer, Heidelberg, pp 199-224
- Wilhelmi LK, Preuss D** (1999) The mating game: pollination and fertilization in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 18-22
- Wu H, Zhang X, Giraldo JP, Shabala S** (2018) It is not all about sodium: revealing tissue specificity and signalling roles of potassium in plant responses to salt stress. *Plant and Soil* **431**: 1-17
- 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
- Yadav AK, Jha SK, Sanyal SK, Luan S, Pandey GK** (2018) Arabidopsis calcineurin B-like proteins differentially regulate phosphorylation activity of CBL-interacting protein kinase 9. *Biochemical Journal* **475**: 2621-2636
- Yasunari TJ, Stohl A, Hayano RS, Burkhart JF, Eckhardt S, Yasunari T** (2011) Cesium-137 deposition and contamination of Japanese soils due to the Fukushima nuclear accident. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 19530-19534
- Yasutaka T, Miyoshi H, Ito K** (2014) Transfer of radiocesium from hydroponic medium to potherb mustard and tomato plants. *Soil Science and Plant Nutrition* **60**: 818-823
- Zhao J, Cheng NH, Motes CM, Blancaflor EB, Moore M, Gonzales N, Padmanaban S, Sze H, Ward JM, Hirschi KD** (2008) AtCHX13 is a plasma membrane K<sup>+</sup> transporter. *Plant Physiology* **148**: 796-807
- Zhu J** (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 441 - 445
- Zhu JK** (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 66-71
- Zhu JK** (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* **167**: 313-324
- Zielinski RE** (1998) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 697-725



RESEARCH PAPER

# Arabidopsis K<sup>+</sup> transporter HAK5-mediated high-affinity root K<sup>+</sup> uptake is regulated by protein kinases CIPK1 and CIPK9

Alberto Lara<sup>1</sup>, Reyes Ródenas<sup>1</sup>, Zaida Andrés<sup>2</sup>, Vicente Martínez<sup>1</sup>, Francisco J. Quintero<sup>3</sup>, Manuel Nieves-Cordones<sup>1</sup>, M. Angeles Botella<sup>4</sup> and Francisco Rubio<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Nutrición Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-CSIC, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

<sup>2</sup> Department of Plant Developmental Biology, Centre for Organismal Studies, Heidelberg University, 69120 Heidelberg, Germany

<sup>3</sup> Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Universidad de Sevilla, Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla, Spain

<sup>4</sup> Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Alicante 03312, Spain

\* Correspondence: [frubio@cebas.csic.es](mailto:frubio@cebas.csic.es)

Received 31 December 2019; Editorial decision 24 April 2020; Accepted 28 April 2020

Editor: Karl-Josef Dietz, Bielefeld University, Germany

## Abstract

The high-affinity K<sup>+</sup> transporter HAK5 is the major contributor to root K<sup>+</sup> uptake from dilute solutions in K<sup>+</sup>-starved Arabidopsis plants. Its functionality is tightly regulated and its activity is enhanced under K<sup>+</sup> starvation by the transcriptional induction of the *AtHAK5* gene, and by the activation of the transporter via the AtCBL1–AtCIPK23 complex. In the present study, the 26 members of the Arabidopsis CIPK protein kinase family were screened in yeast for their capacity to activate HAK5-mediated K<sup>+</sup> uptake. Among them, AtCIPK1 was the most efficient activator of AtHAK5. In addition, AtCIPK9, previously reported to participate in K<sup>+</sup> homeostasis, also activated the transporter. In roots, the genes encoding AtCIPK1 and AtCIPK9 were induced by K<sup>+</sup> deprivation and *atcipk1* and *atcipk9* Arabidopsis KO mutants showed a reduced AtHAK5-mediated Rb<sup>+</sup> uptake. Activation of AtHAK5 by AtCIPK1 did not occur under hyperosmotic stress conditions, where AtCIPK1 function has been shown to be required to maintain plant growth. Taken together, our data contribute to the identification of the complex regulatory networks that control the high-affinity K<sup>+</sup> transporter AtHAK5 and root K<sup>+</sup> uptake.

**Keywords:** Arabidopsis, AtCBL, AtCIPK, AtHAK5, potassium, uptake.

## Introduction

Potassium (K<sup>+</sup>) is an essential macronutrient for plants. Its acquisition by the root from the soil solution is a crucial process for plant growth and development because K<sup>+</sup> fulfills important functions within the plant cells (White and Karley, 2010). To accomplish these functions, the cytosolic K<sup>+</sup> concentration should be maintained constant, around 100 mM (Leigh and Wyn Jones, 1984), which contrasts with the highly variable K<sup>+</sup> concentrations of the soil solution. In many cases, the K<sup>+</sup> concentration gradient across the root cell plasma membrane is several orders of magnitude. In spite of this, K<sup>+</sup> accumulation in

the cell is ensured by the operation of specific K<sup>+</sup> transport systems and by the existence of the electrochemical H<sup>+</sup>-gradient across the plasma membrane generated by the H<sup>+</sup>-ATPase (White and Karley, 2010) that drives K<sup>+</sup> entry into the cell.

In Arabidopsis, two transport systems, AtHAK5 and AKT1, are the major contributors to root K<sup>+</sup> uptake. The Arabidopsis model can be, to some extent, applied to other plant species (Nieves-Cordones *et al.*, 2016). Depending on the external K<sup>+</sup> concentration, each of these two systems dominates K<sup>+</sup> uptake. This requires a fine-tuned regulation of AtHAK5 and AKT1

activities. At very low external  $K^+$  concentrations, below 20  $\mu\text{M}$ , the high-affinity  $K^+$  transporter, AtHAK5, is fully active and it is the only system mediating  $K^+$  uptake (Rubio et al., 2008, 2010; Pyo et al., 2010). The increase in AtHAK5 activity at low external  $K^+$  is achieved by the transcriptional activation of the AtHAK5 gene (Ahn et al., 2004; Nieves-Cordones et al., 2010) and by the activation of the transporter by AtCIPK23-mediated phosphorylation (Ragel et al., 2015).

Because plants are sessile organisms, regulation of the activity of the transport systems involved in the acquisition of essential nutrients is of paramount importance for plant growth, development, and adaptation under a constantly changing environment. Members of the Calcineurin B-Like Protein-Interacting Protein Kinase (CIPK) family are emerging as pivotal elements of the regulation of transporters for different nutrients in plants and in stress responses. These kinases form complexes with  $\text{Ca}^{2+}$  sensors of the Calcineurin-B Like (CBL) protein family and phosphorylate the final targets for their activation (Pandey et al., 2014; Cherel and Gaillard, 2019). Some of these kinases, such as AtCIPK23, regulate several transport systems and, conversely, a given transporter can be activated by different AtCIPKs (Pandey et al., 2014). Identifying the elements involved in the regulation of the transport systems will deepen our knowledge of the mechanisms involved in plant nutrition and stress tolerance, and provide tools for their improvement.

In the present study, we have screened the 26 Arabidopsis CIPKs for their capacity to activate AtHAK5. Several members of this family of kinases promote activation of AtHAK5-mediated  $K^+$  uptake in yeast. Among them, we identified AtCIPK1 and AtCIPK9 which, in cooperation with AtCBL1 or AtCBL9, regulate root high-affinity  $K^+$  uptake via AtHAK5. The results add more evidence to the idea that a complex regulatory network modulates root  $K^+$  acquisition via AtHAK5.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

Arabidopsis WT ecotype Col-0 and its described mutants *athak5-3*, *akt1-2*, *atc1pk23-5*, *athak5-3atc1pk23-5*, and *akt1-2atc1pk23-5* were used (Ragel et al., 2015). The *atc1pk1-1* (D'Angelo et al., 2006) and the *atc1pk9-1* (Liu et al., 2013) mutants have been described previously and were kindly provided by Dr J. Kudla (University of Münster) and Dr Y. Wang (China Agricultural University), respectively. The double mutants *athak5-3atc1pk1-1*, *akt1-2atc1pk1-1* and *atc1pk23-5atc1pk1-1* were obtained here by crossing the corresponding single mutants. Plants were grown hydroponically as described previously (Nieves-Cordones et al., 2019) in a modified 1/5 Hoagland solution that contained the following macronutrients (mM): 1.4 KCl, 1.4  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.35  $\text{MgSO}_4$ , and 0.1  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ , and the following micronutrients ( $\mu\text{M}$ ): 50  $\text{CaCl}_2$ , 12.5  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2  $\text{MnSO}_4$ , 1  $\text{ZnSO}_4$ , 0.5  $\text{CuSO}_4$ , 0.1  $\text{H}_2\text{MoO}_4$ , 0.1  $\text{NiSO}_4$ , and 10 Fe-EDDHA. To starve the plants of  $K^+$ , a nutrient solution without KCl was used. To impose a hyperosmotic stress treatment, mannitol was added to the growth solution to reach a final concentration of 300 mM. For that purpose, plants were grown under control 1/5 Hoagland (1.4 mM  $K^+$ ) solution conditions for 28 d and then starved of  $K^+$  for 12 d. During this 12 d time period of  $K^+$  starvation, mannitol concentration was increased progressively (to 150 mM at day 11 and 300 mM at day 12). Plants were grown in a growth chamber under controlled conditions with a photon flux density of 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 8/16 h light/dark photoperiod, at 22 °C and 65% relative humidity.

### Yeast and bacterial strains, growth and plasmids

The *trk1 trk2* 9.3 yeast strain (MATa, *ena1Δ::HIS3::ena4Δ*, *leu2*, *ura3*, *trp1*, *ade2*, *trk1Δ*, *trk2::pCK64*; Bañuelos et al., 1995), deficient in its endogenous  $K^+$  uptake systems, TRK1 and TRK2, was used. The TOP10 *Escherichia coli* bacterial strain was used for routine plasmid propagation. The cDNAs of the 26 Arabidopsis CIPKs were cloned into the yeast expression vector pGPD414 (Mumberg et al., 1995). AtCBL1 and AtCBL9 cDNAs were cloned into pYPGE15 yeast expression vector and the AtHAK5 cDNA under the control of the PMA1 promoter was cloned into the pRS425 (Ragel et al., 2015) yeast vector. Plasmids were transformed into yeast as described previously (Elble, 1992). Synthetic SD media (Sherman, 1991) were used for transformant selection. The minimal AP medium (Rodríguez-Navarro and Ramos, 1984), supplemented with different amounts of  $K^+$  as indicated, was used for yeast complementation assays. For that purpose, yeast suspensions were brought to OD<sub>550</sub> of 1 and then 10  $\mu\text{l}$  drops of serial dilutions of the suspensions were inoculated on plates with solid AP medium and incubated at 28 °C.

### Real-time qPCR

Total RNA was extracted from Arabidopsis roots by using the Macherey-Nagel NucleoSpin RNA Plant kit (Neumann-Neander, Germany) and treated with DNA-free™ kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to eliminate contaminating DNA from the RNA samples. cDNA was synthesized with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR was performed in a 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific), using default cycle settings. Relative expression levels of *AtCIPK1*, *AtCIPK9*, *AtCIPK23*, and *AtHAK5* are given as  $\log_2(\text{fold-change (FC)})$ , and FC was determined by the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method (Livak and Schmittgen, 2001) using the *AtPP2A* gene as reference gene (Czechowski et al., 2005); the WT 1.4 mM  $K^+$  treatment could be used as the calibrator sample as no significant differences in the C<sub>t</sub> values among the different plant lines were observed for the reference gene. The primers used are listed in Supplementary Table S1 at JXB online.

### Rb<sup>+</sup> uptake experiments in plants

Plants were grown in the described 1/5 modified Hoagland solution for 28 d and then for 12 d in a solution without  $K^+$ . Then, plants were transferred to a solution with no  $K^+$  containing 20  $\mu\text{M}$  RbCl for 6 h. The use of Rb<sup>+</sup> as a tracer for determining root  $K^+$  uptake has been described in previous studies (Ragel et al., 2015). After the 6 h of incubation in the presence of Rb<sup>+</sup>, plants were harvested, separated into roots and shoots and dried at 65 °C for 3 d. Then, the dry weights of roots and shoots were determined and the plant organs were subjected to digestion with  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$  (2:1, v/v). Rb<sup>+</sup> content in roots and shoots was determined by inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometry by using an Iris Intrepid II ICP spectrometer (Thermo Electron Corp., Franklin, MA, USA). For each repetition, the Rb<sup>+</sup> accumulated in the plant was calculated by the addition of the total Rb<sup>+</sup> accumulated in the root and in the shoot. Rb<sup>+</sup> uptake rates were determined by the accumulation of Rb<sup>+</sup> in the plants per gram of root dry weight and unit time.

### Statistical analysis

Analysis of variance was performed with StatistixV.8 for Windows (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). To perform the statistical analyses, gene expression data were expressed as  $\log_2\text{FC}$  (Rieu and Powers, 2009). The differences in means were compared by using Tukey's multiple range test ( $P < 0.05$ ).

## Results

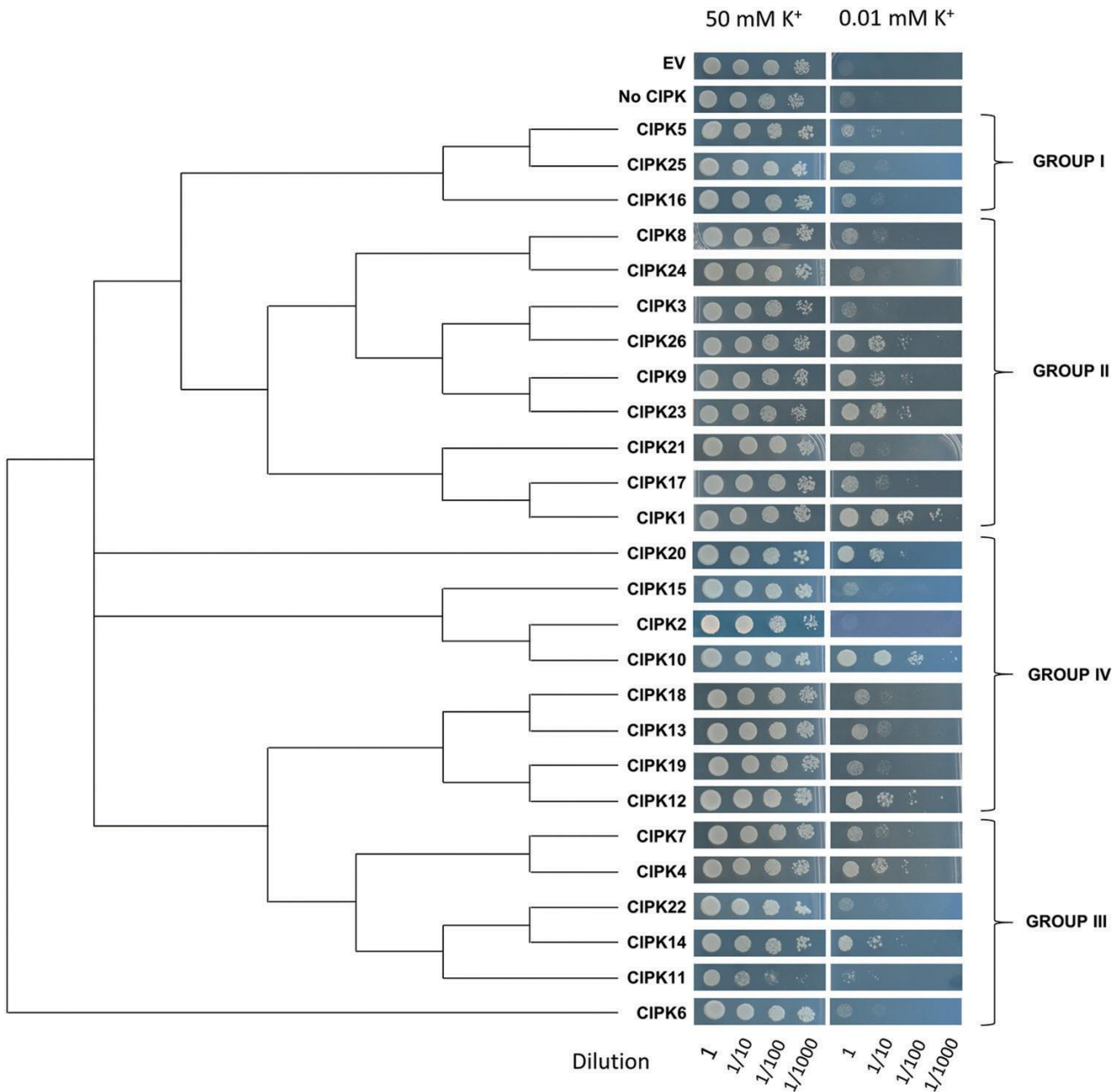
### Several CIPKs activate AtHAK5 in yeast irrespective of their phylogenetic group

To identify CIPKs other than AtCIPK23 that activate AtHAK5, the 26 Arabidopsis CIPK protein kinases were co-expressed



together with the Ca<sup>2+</sup> sensor AtCBL1 and the K<sup>+</sup> transporter AtHAK5 in a yeast *trk1 trk2* mutant impaired in K<sup>+</sup> acquisition. AtCBL1 was chosen for the initial screening because, together with AtCBL9, it was previously reported to contribute to low-K<sup>+</sup> tolerance in Arabidopsis plants (Xu *et al.*, 2006; Cheong *et al.*, 2007) and to activate AtHAK5 in yeast in cooperation with AtCIPK23 (Ragel *et al.*, 2015). Drop test assays with yeast transformants under K<sup>+</sup>-sufficient (50 mM) and K<sup>+</sup>-limiting conditions (0.01 mM) were used to evaluate yeast growth and the complementation capacity promoted by the different kinases. To determine possible relationships between the phylogeny of the Arabidopsis CIPK family and the

complementation capacity of each CIPK, a phylogenetic tree of the 26 Arabidopsis CIPKs was obtained. The results of the drop test for each kinase were displayed according to the obtained CIPK phylogenetic tree (Fig. 1). Control transformants included yeast transformed with the empty vectors and yeast transformed with AtHAK5 and AtCBL1. The results showed that all yeast strains grew well in media with a high concentration of K<sup>+</sup> (50 mM). At the low K<sup>+</sup> concentration (0.01 mM K<sup>+</sup>), the yeast mutant expressing the empty vectors (EV) and that transformed with AtHAK5 together with AtCBL1 (labeled in the figure as No CIPK) did not grow. By contrast, expression of the AtHAK5 transporter together with AtCBL1



**Fig. 1.** Growth tests for yeast expressing AtHAK5, AtCBL1, and the 26 Arabidopsis CIPKs. Yeast strain 9.3, deficient in the endogenous K<sup>+</sup> uptake systems, was transformed with vectors containing AtHAK5, AtCBL1, and the 26 AtCIPKs. Control strains were transformed with the empty vectors (EV) or with AtHAK5 and AtCBL1 (No CIPK). Ten microliter drops of decimal dilutions of yeast transformant suspensions were grown on minimal AP medium supplemented with 50 or with 0.01 mM K<sup>+</sup>. Images of yeast transformed with the different kinases are arranged according to the AtCIPK family phylogenetic tree. The four phylogenetic groups of the family are indicated. (This figure is available in color at JXB online.)

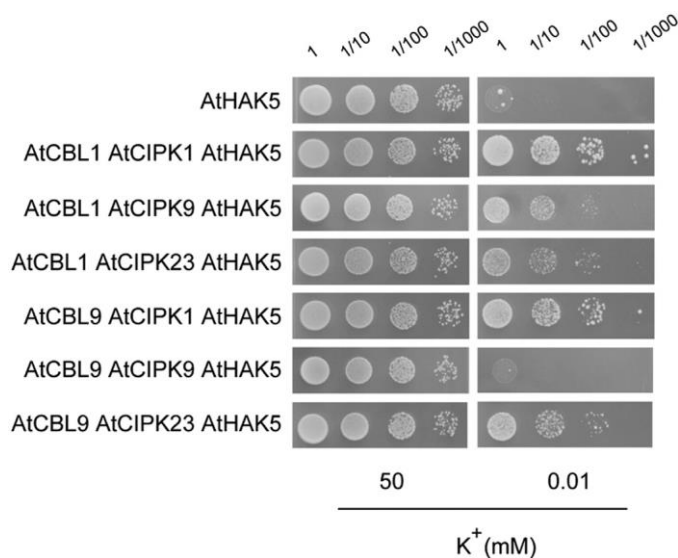
and AtCIPK23 promoted a vigorous yeast growth. These results are in agreement with previous studies (Ragel et al., 2015) and showed the activation of the AtHAK5 K<sup>+</sup> transporter by the AtCBL1–AtCIPK23 complex in yeast. When growth of the yeast strains expressing AtHAK5 together with AtCBL1 and the different AtCIPKs was analysed, it could be observed that the 26 AtCIPKs produced different levels of complementation. Some of them, such as AtCIPK2, 3, 6, 11, 15, 21, 22, 24, and 25, did not improve growth. Others, such as AtCIPK5, 8, 13, 16, 17, 18, and 19, produced a slight improvement of yeast growth. Some CIPKs, such as AtCIPK4, 7, 9, 10, 12, 14, 20, and 26, improved yeast growth and AtCIPK1 was the one that improved yeast growth the most. Because AtCIPK9 was previously shown to play an important role in K<sup>+</sup> homeostasis (Pandey et al., 2007; Liu et al., 2013; Singh et al., 2018; Yadav et al., 2018) and AtCIPK1 promoted the most vigorous yeast growth (Fig. 1), these two kinases were chosen for further characterization.

The described complementation assays (Fig. 1) were performed with the AtHAK5 transporter and the AtCBL1 Ca<sup>2+</sup> sensor. However, in addition to AtCBL1, AtCBL9 has also been described to interact with AtCIPK1 (D'Angelo et al., 2006) as well as with AtCIPK9 (Liu et al., 2013; Yadav et al., 2018). Therefore, the activation of AtHAK5 by the AtCBL9–AtCIPK1 and the AtCBL9–AtCIPK9 complexes was studied in yeast. As a control, the AtCBL9–AtCIPK23 complex, which has been also shown to activate AtHAK5 (Ragel et al., 2015), was included in the study. It was observed that both AtCBL1 and AtCBL9 promoted a similar growth in the presence of 0.01 mM K<sup>+</sup> of yeast cells expressing AtHAK5 and AtCIPK1 (Fig. 2). Regarding AtCIPK9, expression of AtCBL1 and AtCIPK9 together with AtHAK5 allowed yeast growth at 0.01 mM K<sup>+</sup>, but this did not occur when the AtCBL9 Ca<sup>2+</sup> sensor was tested (Fig. 2). As shown previously (Ragel

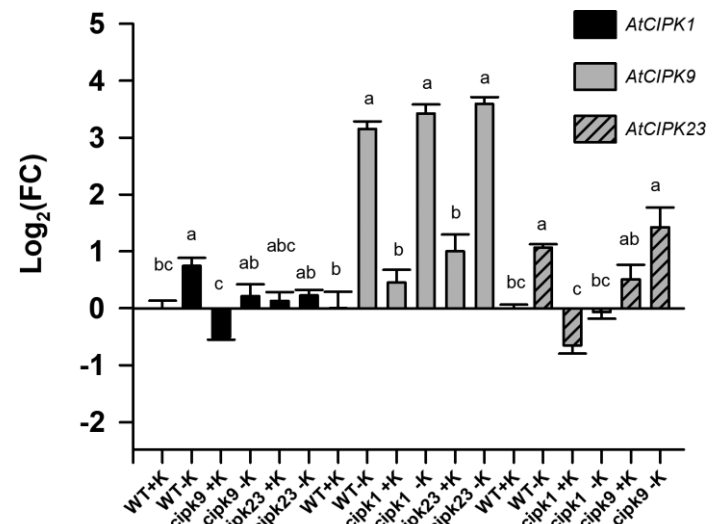
et al., 2015), the two Ca<sup>2+</sup> sensors also led to yeast growth at 0.01 mM K<sup>+</sup> of yeast cells expressing AtCIPK23 and AtHAK5 (see below, Fig. 2).

### Transcriptional regulation of CIPK1 and CIPK9 in response to external K<sup>+</sup>

The genes encoding the AtCIPK23 (Xu et al., 2006) and the AtCIPK9 (Pandey et al., 2007; Singh et al., 2018) kinases were shown to be upregulated by K<sup>+</sup> deficiency. The AtCIPK23 kinase was reported to activate the AtHAK5 transporter (Ragel et al., 2015) and the results presented here show that AtCIPK1 as well as AtCIPK9 also activated AtHAK5 in yeast (Figs 1, 2). Therefore, the response of the genes encoding AtCIPK1, AtCIPK9, and AtCIPK23 to K<sup>+</sup> deprivation was studied under our experimental conditions. Plants grown for 28 d under control conditions in 1/5 Hoagland (1.4 mM K<sup>+</sup>) were subjected to K<sup>+</sup> starvation by transferring them for 12 d to a nutrient solution with no K<sup>+</sup> added. After this time period, roots were collected, their RNA extracted, and the response of the *AtCIPK1*, *AtCIPK9*, and *AtCIPK23* genes determined by qPCR. It was observed that, in WT plants, K<sup>+</sup> starvation significantly induced the expression of the genes encoding the three kinases (Fig. 3). *AtCIPK1* and *AtCIPK23* showed a mild induction ( $\log_2FC=0.714\pm0.14$  and  $1.06\pm0.06$ , respectively), while *AtCIPK9* showed a much higher one ( $\log_2FC=3.15\pm0.13$ ). In addition, the expression of these three genes was also determined in the *atciph1*, *atciph9*, and *ciph23* mutant lines, to study possible compensatory effects derived from gene transcription.



**Fig. 2.** Growth tests for yeast expressing AtHAK5 and the indicated combinations of AtCIPK1, AtCIPK9, AtCIPK23, AtCBL1, and AtCBL9. The growth assay was performed as indicated in Fig. 1 with yeast transformed with expression vectors for the indicated proteins. (This figure is available in color at JXB online.)



**Fig. 3.** Expression levels of the *AtCIPK1*, *AtCIPK9*, and *AtCIPK23* genes in roots of WT, *atciph1*, *atciph9*, and *atciph23* plants in response to K<sup>+</sup> deprivation. Plants of the WT, *atciph1*, *atciph9*, and *atciph23* lines were grown under K<sup>+</sup>-sufficient conditions for 28 d and then for 12 d in a K<sup>+</sup>-free solution. A set of control plants remained in the K<sup>+</sup>-sufficient conditions. Roots were harvested, their RNA isolated, and cDNA synthesized. qPCR was performed on cDNAs with specific primers for *AtCIPK1*, *AtCIPK9*, and *AtCIPK23*. *AtPP2A* was used as reference gene and the WT+K sample as calibrator control. Fold-change (FC) in gene expression was calculated by the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. Shown are log<sub>2</sub>FC average values of six independent repetitions and error bars denote standard error. Bars with different letters in data for each gene are significantly different at P<0.05 according to Tukey's test.



It was observed that, under K<sup>+</sup> starvation, the *AtCIPK1* gene was not induced in the *atcipk9* and *atcipk23* backgrounds and the *atcipk23* gene was not induced in the *atcipk1* background. The strong induction of the *AtCIPK9* gene was not affected by knocking out the genes encoding the other two kinases.

### *AtCIPK1 and AtCIPK9 activate AtHAK5 in planta*

The results obtained in yeast suggested that AtCIPK1 and AtCIPK9 might regulate the activity of AtHAK5 in *planta*. To check this possibility Arabidopsis KO mutants with a T-DNA insertion in *AtCIPK1* and in *AtCIPK9* were characterized. For the study, Rb<sup>+</sup> uptake from a 20 μM external solution was determined in K<sup>+</sup>-starved plants. Plants of the WT, single and double *athak5*, *akt1*, *atcipk1*, and *atcipk23* mutant lines were included as a control. The Rb<sup>+</sup> uptake from a 20 μM external concentration in K<sup>+</sup>-starved plants, where AtHAK5 is the major contributor (Pyo *et al.*, 2010; Nieves-Cordones *et al.*, 2019), together with the KO lines employed allowed determination of whether AtHAK5 was regulated by AtCIPK1 and AtCIPK9.

It was observed that, in comparison with WT plants, the absence of AtHAK5 importantly affected Rb<sup>+</sup> uptake, reducing it 86.5% (Fig. 4). By contrast, the absence of the AKT1 channel did not affect the rate of Rb<sup>+</sup> uptake. Rb<sup>+</sup> uptake in the *athak5akt1* double mutant was almost negligible. These results showed that, under these conditions, AtHAK5 was the major contributor to Rb<sup>+</sup> uptake, in agreement with previous results (Pyo *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2010). The absence of AtCIPK1 or AtCIPK23 reduced Rb<sup>+</sup> uptake 28.9% or 47.1%, respectively (Fig. 4A). In agreement with the idea that under these conditions AtHAK5 is the major contributor to Rb<sup>+</sup> uptake, the double mutants *athak5atcipk1* and *athak5atcipk23* showed the same Rb<sup>+</sup> uptake as the *athak5* single mutant while the double mutants *atcipk1akt1* and *atcipk23akt1* showed a lower rate of Rb<sup>+</sup> uptake than the *akt1* single mutant (Fig. 4A). In

other experiments that included the WT, *athak5*, and *atcipk23* lines as controls, the *atcipk9* line was assayed (Fig. 4B). It was observed that mutation of AtCIPK9 reduced Rb<sup>+</sup> uptake 55%.

The reduced AtHAK5-mediated Rb<sup>+</sup> uptake observed in the *atcipk1*, the *atcipk9*, and the *atcipk23* lines could be due to a lower expression level of the *AtHAK5* gene in these lines. To study this possibility, the expression of *AtHAK5* was determined by qPCR in the WT, *atcipk1*, *atcipk9*, and *atcipk23* lines, under K<sup>+</sup>-sufficient and K<sup>+</sup>-starvation conditions. It could be observed that K<sup>+</sup> starvation induced to the same level the expression of *AtHAK5* in WT, *atcipk1*, and *atcipk23* lines (Fig. 5).

*AtHAK5* was also strongly induced in the *atcipk9* line, although to a lesser extent than in the other two mutant *cipk* lines. Interestingly, *AtHAK5* was partially induced in the *atcipk9* and *atcipk23* mutants under K<sup>+</sup>-sufficient conditions. In conclusion, the important reduction in Rb<sup>+</sup> uptake rate shown by the *atcipk1*, *atcipk9*, and *atcipk23* mutants (Fig. 4) could not be explained by a reduced expression of the *AtHAK5* gene (Fig. 5).

### *AtCIPK1 is not involved in AtHAK5 activation under hyperosmotic stress*

AtCIPK1 has been shown to be involved in plant tolerance to hyperosmotic stress (D'Angelo *et al.*, 2006). Therefore, the

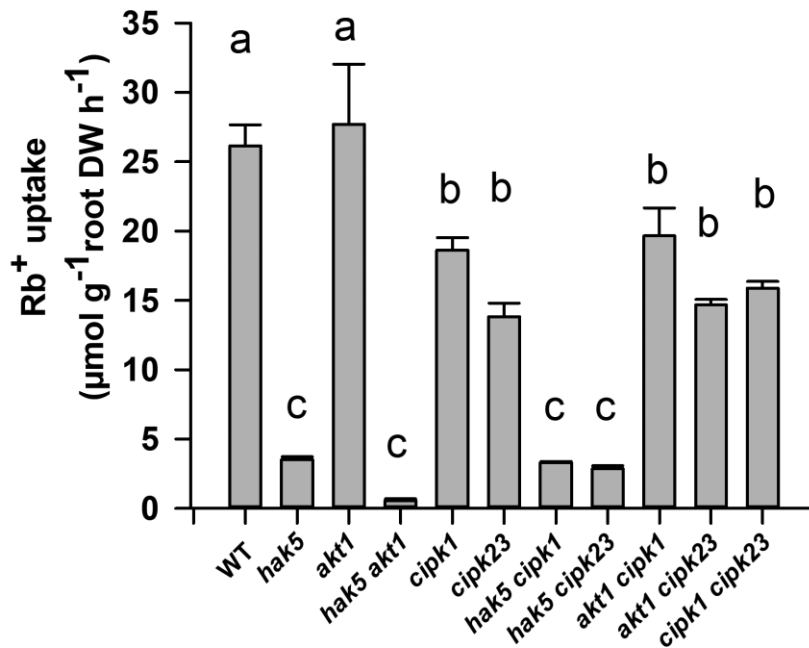
possibility that this kinase regulated the AtHAK5 transporter under those stress conditions was studied. Plants of the WT and the *atcipk1* lines were grown under control 1/5 Hoagland (1.4 mM K<sup>+</sup>) solution conditions for 28 d and then starved of K<sup>+</sup> for 12 d. In addition, a hyperosmotic stress was applied to half of the plants by adding 300 mM mannitol to the growth solution as 150 mM mannitol at each of two times, at days 11 and 12 of K<sup>+</sup> starvation. After these treatments, the Rb<sup>+</sup> uptake rate from a 20 μM solution was determined. As shown above, K<sup>+</sup>-starved WT plants showed high rates of Rb<sup>+</sup> uptake, similar to those of the *akt1* plants. The *athak5* line showed very low rates of Rb<sup>+</sup> uptake and the *atcipk1* and *atcipk23* lines lower Rb<sup>+</sup> uptake rates than the WT line (Fig. 6). The hyperosmotic stress treatment importantly reduced the rate of Rb<sup>+</sup> uptake in all plants. WT and *atcipk1* lines showed similar rates of Rb<sup>+</sup> uptake, and the remaining lines showed lower Rb<sup>+</sup> uptake rates than those two lines. Thus, the absence of the AtCIPK1 kinase did not lead to any effect on the accumulation of Rb<sup>+</sup> when the plants were exposed to a hyperosmotic stress.

## Discussion

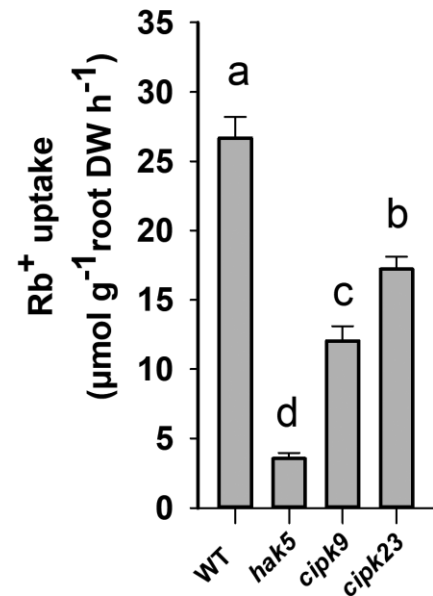
The high-affinity AtHAK5 K<sup>+</sup> transporter is the major system mediating K<sup>+</sup> uptake into Arabidopsis roots when the external K<sup>+</sup> concentration is lower than 20 μM (Nieves-Cordones *et al.*, 2016; Fig. 4). Thus, its function is crucial for plant K<sup>+</sup> nutrition at low K<sup>+</sup> supply and AtHAK5 is activated under conditions of low external K<sup>+</sup>. One of the mechanisms involved in AtHAK5 regulation is its activation by the AtCIPK23 kinase (Ragel *et al.*, 2015). In addition to the AtHAK5 K<sup>+</sup> transporter, the AtCIPK23 kinase has been also described to modulate the activity of several transport systems involved in the acquisition of nutrients other than K<sup>+</sup> such as NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Ho *et al.*, 2009), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Straub *et al.*, 2017) and iron (Tian *et al.*, 2016; Dubeaux *et al.*, 2018). Thus, AtCIPK23 seems to play a predominant role in regulating mineral nutrition of plants. Opposite to the mentioned activation of different transport systems by the same kinase, it has also been shown that a transport system can be activated by different CIPKs. For example, the inward rectifier K<sup>+</sup> channel AKT1 is activated by the AtCIPK6, AtCIPK16, and AtCIPK23 kinases (Lee *et al.*, 2007). Thus, complex regulatory networks seem to modulate the activity of the transport systems involved in nutrient acquisition at the roots of plants.

To gain more insights into regulatory elements of AtHAK5, activation of this transporter by CIPKs other than AtCIPK23 was tested here. The 26 Arabidopsis CIPKs were screened for functional complementation in growth experiments at low K<sup>+</sup> in yeast cells expressing AtHAK5 and the Ca<sup>2+</sup> sensor AtCBL1. The results suggested that, in addition to AtCIPK23, other AtCIPKs could also activate AtHAK5. These kinases promoted different yeast growth capacities, from the absence of growth to vigorous growth (Fig. 1), indicating that AtHAK5 was preferentially activated by some of these kinases. A clear relationship between the growth-promoting capacity of the kinases and their phylogeny could not be observed. Thus, members belonging to the same phylogenetic group of the AtCIPK family mediated different levels of yeast complementation. These results lend support to the idea that, although phylogeny provides highly valuable information, the function of a protein

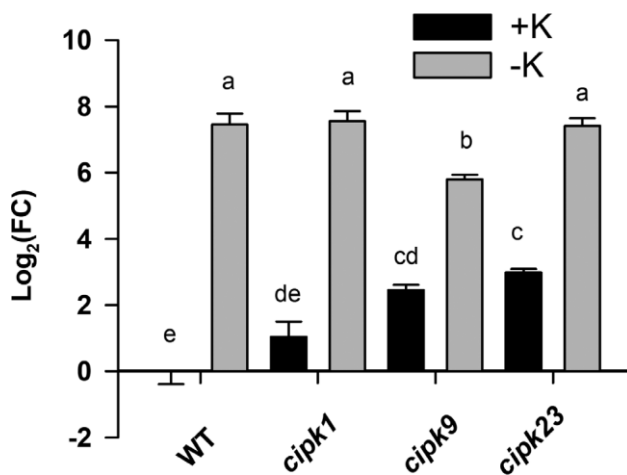
A



B



**Fig. 4.** Effect of the *atc1kp1* (A) or *atc1kp9* (B) mutation on Rb<sup>+</sup> uptake in K<sup>+</sup>-starved plants. (A) The effect of the *atc1kp1* mutation on Rb<sup>+</sup> uptake was studied by comparison with the WT, *athak5*, *akt1*, *atc1kp23*, and the indicated double mutant lines. (B) The effect of the *atc1kp9* on Rb<sup>+</sup> uptake mutation was assayed in comparison with the control WT, *athak5* and *atc1kp23* lines. Plants of the indicated lines were grown for 28 d under K<sup>+</sup> sufficient conditions and then for 12 d in a K<sup>+</sup>-free solution, and then transferred to a K<sup>+</sup>-free solution supplemented with 20 µM RbCl for 6 h. Plant roots and shoots were collected, dried, and acid digested to determine their internal Rb<sup>+</sup> concentrations. For each repetition, the Rb<sup>+</sup> accumulated in the plant was calculated by the addition of the total Rb<sup>+</sup> accumulated in the root and in the shoot. The Rb<sup>+</sup> uptake rates were calculated from the Rb<sup>+</sup> accumulated within the plant per unit root dry weight and unit time. Shown are averages of three independent repetitions and error bars denote standard error. Bars with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  according to Tukey's test.

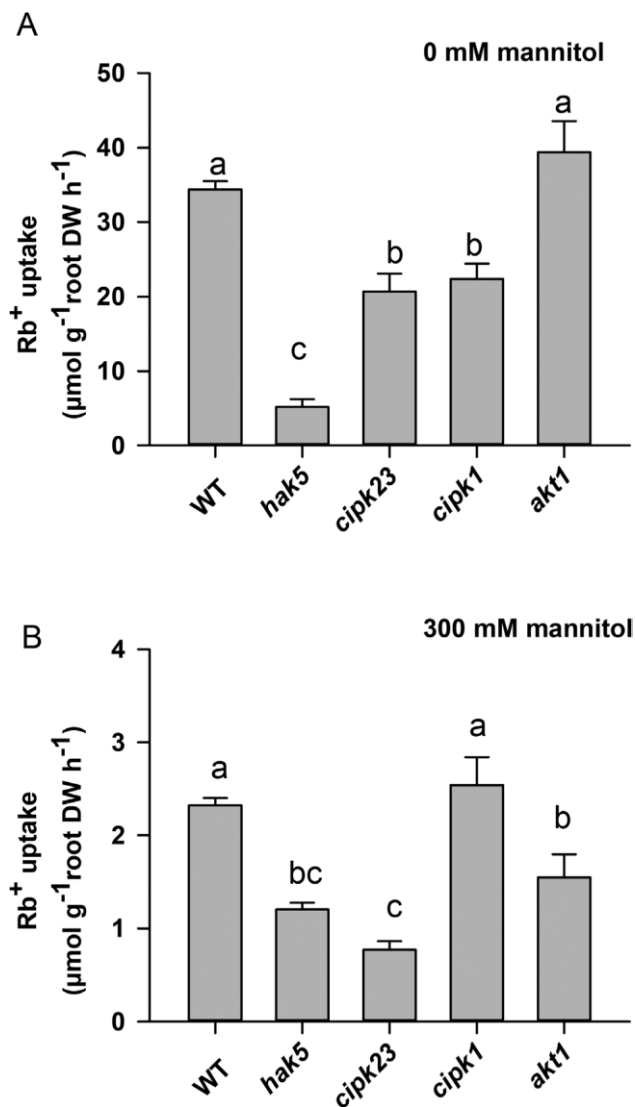


**Fig. 5.** Induction of the *AtHAK5* gene in different plant lines in response to K<sup>+</sup> deprivation. Plants of the indicated lines were grown and processed as indicated in Fig 3. The WT+K sample was used as calibrator control and the fold-change (FC) in gene expression was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Shown are average  $\log_2$ FC values of six independent repetitions, and error bars denote standard error. Bars with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  according to Tukey's test.

cannot be directly inferred from its phylogenetic relationships and that functional tests are required for that purpose. It is worth noting that the interaction of AtHAK5 with AtCIPK23 and AtCIPK9 was not detected in previous attempts (Li et al.,

2006; Pandey et al., 2007; Liu et al., 2013) by using a yeast two-hybrid approach, for instance, to disclose physical interaction. Other approaches to study these physical interactions such as the split-ubiquitin system may be a good alternative (Grefen et al., 2009). Our results indicate that the functional complementation assay for growth at low K<sup>+</sup> in yeast is an appropriate method for studying AtHAK5 regulatory proteins. After the AtCIPK screening in yeast, AtCIPK1 could be identified as the kinase that produced the fastest yeast growth (Fig. 1). Importantly, AtCIPK9 has been previously reported to be involved in K<sup>+</sup> homeostasis (Pandey et al., 2007; Liu et al., 2013; Singh et al., 2018; Yadav et al., 2018), and we found that it activated AtHAK5 in this initial screening (Fig. 1). Therefore, these two kinases were chosen for further characterization.

The AtCIPK screening carried out here was performed with the AtCBL1 Ca<sup>2+</sup> sensor, but the two selected kinases, AtCIPK1 and AtCIPK9, have been previously reported to strongly interact not only with AtCBL1 but also with AtCBL9 (D'Angelo et al., 2006; Liu et al., 2013; Yadav et al., 2018). Here we show that, in addition to the AtCIPK1–AtCBL1–9 complex, the AtCIPK9–AtCBL1 complex, but not the AtCIPK9–AtCBL9 complex, also led to activation of AtHAK5 (Fig. 2). The two Ca<sup>2+</sup> sensors, AtCBL1 and AtCBL9, also activate AtHAK5 (Ragel et al., 2015) as well as the inward-rectifier AKT1 (Xu et al., 2006) via the AtCIPK23 kinase. It is worth noting that the AKT1 channel is not activated by either AtCIPK1 (Lee et al., 2007) or by AtCIPK9 (Pandey et al., 2007;



**Fig. 6.** Rb<sup>+</sup> uptake in K<sup>+</sup>-starved plants of different lines. Plants of the indicated lines were grown for 28 d in K<sup>+</sup>-sufficient conditions and then (A) for 12 d in a K<sup>+</sup>-free solution or (B) in a K<sup>+</sup>-free solution to which mannitol was added on days 11 and 12 of the 12 d K<sup>+</sup>-starvation period to reach a final concentration of 300 mM. Plants were transferred to a K<sup>+</sup>-free solution with 20 μM RbCl for 6 h and processed as indicated in Fig. 4 to calculate the Rb<sup>+</sup> uptake rates. Shown are averages of three independent repetitions, and error bars denote standard error. Bars with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  according to Tukey's test.

Liu *et al.*, 2013). It seems likely that different combinations of CBLs and CIPKs compose regulatory complexes for fine tuning the modulation of root K<sup>+</sup> uptake via AtHAK5 and AKT1 activities. The two Ca<sup>2+</sup> sensors AtCBL1 and AtCBL9, and the three kinases, AtCIPK1, AtCIPK9, and AtCIPK23, emerge as important pieces of the regulation of K<sup>+</sup> uptake at the plant roots. Since our initial screening was performed with AtCBL1, it could not be ruled out that AtCBLs different from AtCBL1 could activate AtHAK5 in combination with some of the AtCIPK kinases that did not lead to yeast complementation in our screening. This opens the modulation of AtHAK5 activity and of root K<sup>+</sup> uptake to the existence of additional regulatory elements and higher levels on complexity, which deserves further investigation.

The results of AtHAK5 activation in yeast by AtCIPK1 and AtCIPK9 (Figs 1, 2) and the transcriptional induction of the *AtCIPK1* and *AtCIPK9* genes (Fig. 3) in roots by K<sup>+</sup> starvation, under the same conditions that induce the *AtHAK5* gene encoding the K<sup>+</sup> transporter (Fig. 5), suggested a role for these kinases in regulating AtHAK5-mediated high-affinity root K<sup>+</sup> uptake. The results with the Arabidopsis KO lines (Fig. 4) confirmed such a role *in planta*. Under the experimental conditions used, AtHAK5 is the major contributor to Rb<sup>+</sup> uptake (Fig. 4; Pyo *et al.*, 2010; Nieves-Cordones *et al.*, 2019). The *atcipk1* and *atcipk9* mutations reduced the rate of high-affinity Rb<sup>+</sup> uptake 28.9% and 55% with respect to WT, respectively (Fig. 4). Mutation of the *AtCIPK1*, *AtCIPK9*, or *AtCIPK23* gene had a small effect on the up-regulation of the *AtHAK5* gene induced by K<sup>+</sup> starvation (Fig. 5). Similarly, mutation of *atcipk1*, *atcipk9*, or *atcipk23* had a small effect on the expression of the genes encoding the other two kinases (Fig. 3). These small effects of mutating one gene on the expression of the other genes (Figs 3, 5) could not explain the important reduction in the Rb<sup>+</sup> uptake when one AtCIPK was mutated (Fig. 4). Thus, the most likely explanation for our observations is that, when AtCIPK1 or AtCIPK9 is lacking, the activity of the AtHAK5 transporter is reduced and it can be concluded that AtCIPK1 and AtCIPK9 regulate AtHAK5-mediated high-affinity K<sup>+</sup> uptake at the root.

Previous studies have shown that AtCIPK1 was required for osmotic stress tolerance (D'Angelo *et al.*, 2006). By forming alternative complexes with AtCBL1 or AtCBL9, the kinase could regulate ABA-independent and -dependent responses to abiotic stress. These complexes were shown to be located at the plasma membrane where, as suggested by the authors, they would regulate a plasma membrane ionic transport system. However, no final target for AtCIPK1 kinase was identified in that study. Other studies have related AtCIPK9 function to the maintenance of K<sup>+</sup> homeostasis (Pandey *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2018). Similarly to the studies on AtCIPK1, the studies on AtCIPK9 propose that this kinase may regulate a K<sup>+</sup> transport system, but no final target was identified. Here we identify a target of AtCIPK1 and AtCIPK9 and present physiological and genetic evidences that these two kinases regulate the activity of the AtHAK5 K<sup>+</sup> transporter *in planta*. Regulation of AtHAK5 by AtCIPK1 seems to be unrelated to the role of this kinase in osmotic stress tolerance because we could not observe an effect of AtCIPK1 in AtHAK5-mediated K<sup>+</sup> uptake under hyperosmotic stress conditions (Fig. 6). Interestingly, loss of AtCIPK23 reduced K<sup>+</sup> uptake in both the absence and the presence of osmotic stress (Fig. 6) suggesting that this kinase regulates AtHAK5 under a wider range of conditions than AtCIPK1, something that deserves further investigation.

The results presented here show different levels of yeast complementation by AtCIPK1, AtCIPK9, and AtCIPK23 (Fig. 1). From these differential effects, it is tempting to assign these kinases different levels of contribution to AtHAK5 regulation. However, it should be taken into account that important compensatory effects may take place when one of these kinases is knocked-out in the plant and the relative contribution of each of them to AtHAK5 regulation is difficult to establish. The picture that emerges from many other studies and the



present one is that different CBL Ca<sup>2+</sup> sensors may combine with different CIPK kinases to form complexes that regulate specific protein targets. This plethora of arrangements may provide the molecular mechanisms for the fine regulation of their target proteins.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Table S1. Primers used for determination of expression levels of *AtHAK5*, *AtCIPK1*, *AtCIPK9*, and *AtCIPK23* by qPCR.




## Acknowledgements

This work was funded by grant number 20806/PI/18 from Fundación Séneca de la Región de Murcia, Spain (to FR), grant number AGL2015-74011-JIN from Ministerio de Economía y Competitividad (to MN-C), grant number BIO2015-70946-R (to FJQ) from Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, and grant number BIO2016-81957-REDT from Ministerio de Economía Industria y Competitividad, Spain. MN-C is recipient of a Ramón y Cajal Fellowship (RyC-2017-21924) from Ministerio de Economía y Competitividad, Spain. AL and RR are recipients of an FPU predoctoral contract from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain. We thank Dr Jörg Kudla (University of Münster, Germany) and Dr Yi Wang (China Agricultural University, China) for kindly providing us with seeds of the *atc1pk1* and *atc1pk9* lines, respectively.

## References

- Ahn SJ, Shin R, Schachtman DP. 2004. Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K<sup>+</sup> uptake. *Plant Physiology* **134**, 1135–1145.
- Bañuelos MA, Klein RD, Alexander-Bowman SJ, 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. *The EMBO Journal* **14**, 3021–3027.
- 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.
- Cherel I, Gaillard I. 2019. The complex fine-tuning of K<sup>+</sup> fluxes in plants in relation to osmotic and ionic abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 715.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 5–17.
- D'Angelo C, Weini S, Batistic O, et al. 2006. Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **48**, 857–872.
- Dubeaux G, Neveu J, Zelazny E, Vert G. 2018. Metal sensing by the IRT1 transporter-receptor orchestrates its own degradation and plant metal nutrition. *Molecular Cell* **69**, 953–964.e5.
- Elble R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18–20.
- Grefen C, Obrdlik P, Harter K. 2009. The determination of protein-protein interactions by the mating-based split-ubiquitin system (mbSUS). *Methods in Molecular Biology* **479**, 217–233.
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF. 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184–1194.
- 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, USA* **104**, 15959–15964.
- Leigh RA, Wyn Jones RG. 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 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 of USA* **103**, 12625–12630.
- Liu LL, Ren HM, Chen LQ, Wang Y, Wu WH. 2013. A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein Kinase9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like Protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**, 266–277.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods* **25**, 402–408.
- Mumberg D, Müller R, Funk M. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119–122.
- Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V, Rubio F. 2010. The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K<sup>+</sup> transporter is required for plant growth and K<sup>+</sup> acquisition from low K<sup>+</sup> solutions under saline conditions. *Molecular Plant* **3**, 326–333.
- Nieves-Cordones M, Lara A, Ródenas R, Amo J, Rivero RM, Martínez V, Rubio F. 2019. Modulation of K<sup>+</sup> translocation by AKT1 and AtHAK5 in *Arabidopsis* plants. *Plant, Cell & Environment* **42**, 2357–2371.
- Nieves-Cordones M, Martínez V, Benito B, Rubio F. 2016. Comparison between *Arabidopsis* and rice for main pathways of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> uptake by roots. *Frontiers in Plant Science* **7**, 992.
- Pandey GK, Cheong YH, Kim BG, Grant JJ, Li L, Luan S. 2007. CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis*. *Cell Research* **17**, 411–421.
- Pandey GK, Kanwar P, Pandey A. 2014. Global comparative analysis of CBL-CIPK gene families in plants. Cham: Springer.
- 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 Physiology* **153**, 863–875.
- Ragel P, Ródenas R, García-Martín E, et al. 2015. The CBL-interacting protein kinase CIPK23 regulates HAK5-mediated high-affinity K<sup>+</sup> uptake in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* **169**, 2863–2873.
- Rieu I, Powers SJ. 2009. Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. *The Plant Cell* **21**, 1031–1033.
- Rodríguez-Navarro A, Ramos J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **159**, 940–945.
- Rubio F, Alemán F, Nieves-Cordones M, Martínez V. 2010. Studies on *Arabidopsis athak5, atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K<sup>+</sup> uptake. *Physiologia Plantarum* **139**, 220–228.
- 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. *Physiologia Plantarum* **134**, 598–608.
- Sherman F. 1991. Getting started with yeast. *Methods in Enzymology* **194**, 3–21.
- Singh A, Yadav AK, Kaur K, et al. 2018. A protein phosphatase 2C, AP2C1, interacts with and negatively regulates the function of CIPK9 under potassium-deficient conditions in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **69**, 4003–4015.
- Straub T, Ludewig U, Neuhäuser B. 2017. The kinase CIPK23 inhibits ammonium transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **29**, 409–422.
- Tian Q, Zhang X, Yang A, Wang T, Zhang WH. 2016. CIPK23 is involved in iron acquisition of *Arabidopsis* by affecting ferric chelate reductase activity. *Plant Science* **246**, 70–79.
- White PJ, Karley AJ. 2010. Potassium. In: Hell R, Mendel R-R, ed. *Cell Biology of Metals and Nutrients*. Heidelberg: Springer, 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.
- Yadav AK, Jha SK, Sanyal SK, Luan S, Pandey GK. 2018. *Arabidopsis* calcineurin B-like proteins differentially regulate phosphorylation activity of CBL-interacting protein kinase 9. *The Biochemical Journal* **475**, 2621–2636.

# Root high-affinity K<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> uptake and plant fertility in tomato plants are dependent on the activity of the high-affinity K<sup>+</sup> transporter SIHAK5

Manuel Nieves-Cordones<sup>1</sup>  | Alberto Lara<sup>1</sup> | Martha Silva<sup>2</sup> | Jesús Amo<sup>1</sup> | Pascual Rodríguez-Sepulveda<sup>3</sup> | Rosa M. Rivero<sup>1</sup>  | Vicente Martínez<sup>1</sup> | M. Angeles Botella<sup>4</sup> | Francisco Rubio<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-CSIC, Murcia, Spain

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico Chascomús (INTECH), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), Chascomús, Argentina

<sup>3</sup>Abiopep S.L., Murcia, Spain

<sup>4</sup>Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain

## Correspondence

Francisco Rubio, Departamento de Nutrición Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-CSIC, 30100 Murcia, Spain.  
Email: frubio@cebas.csic.es

## Funding information

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Grant/Award Number: COOPA20177; Fundación Séneca de la Región de Murcia, Grant/Award Number: 20806/PI/18; Ministerio de Economía y Competitividad, Grant/Award Numbers: AGL2015-66434-R, AGL2015-74011-JIN, RyC-2017-21924; Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España, Grant/Award Number: BIO2016-81957-REDT; Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

## Abstract

Root K<sup>+</sup> acquisition is a key process for plant growth and development, extensively studied in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Because important differences may exist among species, translational research supported by specific studies is needed in crops such as tomato. Here we present a reverse genetics study to demonstrate the role of the SIHAK5 K<sup>+</sup> transporter in tomato K<sup>+</sup> nutrition, Cs<sup>+</sup> accumulation and its fertility. *slhak5* KO lines, generated by CRISPR-Cas edition, were characterized in growth experiments, Rb<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> uptake tests and root cells K<sup>+</sup>-induced plasma membrane depolarizations. Pollen viability and its K<sup>+</sup> accumulation capacity were estimated by using the K<sup>+</sup>-sensitive dye Ion Potassium Green 4. SIHAK5 is the major system for high-affinity root K<sup>+</sup> uptake required for plant growth at low K<sup>+</sup>, even in the presence of salinity. It also constitutes a pathway for Cs<sup>+</sup> entry in tomato plants with a strong impact on fruit Cs<sup>+</sup> accumulation. SIHAK5 also contributes to pollen K<sup>+</sup> uptake and viability and its absence produces almost seedless fruits. Knowledge gained into SIHAK5 can serve as a model for other crops with fleshy fruits and it can help to generate tools to develop low Cs<sup>+</sup> or seedless fruits crops.

## KEYWORDS

caesium, pollen, potassium, salinity, transport

## 1 | INTRODUCTION

Potassium (K<sup>+</sup>) is an essential macroelement for plants which fulfils important functions related to growth and development. It is concentrated in growing tissues, contributing to turgor potential and being crucial for processes that require fast growth or rapid movements such as pollen tube elongation or stomatal movements. Besides, it is

involved in many physiological processes such as enzyme activation, neutralization of charges, plasma membrane potential maintenance as well as transcriptional and posttranslational regulation (Amtmann, Hammond, Armengaud, White, & Callow, 2006; Maathuis, 2009; Marschner, 1995). It has a great impact on metabolism (Amtmann & Armengaud, 2009) as well as on the movement of photosynthates and nitrogen compounds to sink tissues (Deeken et al., 2002; Hermans, Hammond, White, & Verbruggen, 2006; Mengel, Kirkby, Kosegarten, & Appel, 2001; White & Karley, 2010), affecting fruit quality and

productivity of crops (Römheld & Kirkby, 2010). Due to all these functions, K<sup>+</sup> generally has a protective effect against biotic and abiotic stresses and plants with a high K<sup>+</sup> content cope better with environmental stresses (Shabala & Pottosin, 2014).

Due to the essential roles it plays, K<sup>+</sup> is required to maintain production and quality of crops. However, large agricultural areas are deficient in K<sup>+</sup> (Luan et al., 2017; Römheld & Kirkby, 2010) and local areas near the root surface may be depleted of K<sup>+</sup> because of its rapid absorption by the root. In addition, two environmental conditions related to K<sup>+</sup> nutrition, salinity and radiocaesium, challenge current agriculture. Salinity is one of the most important stresses limiting crop production, affecting over 800 million hectares around the world. It is estimated that a 20% of irrigated lands, which produce one-third of world food, suffer from secondary salinization. One of the clear effects that high Na<sup>+</sup> concentrations typical of salinized lands have on plants is the induction of K<sup>+</sup> deficiency (Munns, 2005). In relation to this, increasing K<sup>+</sup> supply to plants reduces Na<sup>+</sup>-induced toxicity (Shabala & Pottosin, 2014). A recent analysis suggests that the energy cost of plant K<sup>+</sup> uptake under salt stress can be a limiting factor for plant salt tolerance (Rubio, Nieves-Cordones, Horie, & Shabala, 2020). Radiocaesium released after nuclear accidents has also become an important threat for agriculture due to the large area of land contaminated and its persistence in time (decades) (Yasunari et al., 2011). Radiocaesium, when present in the soil, is rapidly absorbed by crop roots and accumulated in their edible organs (Fujiwara, 2013). Thus, the consumption of radiocaesium-containing food by cattle and humans imposes serious health concerns. It is well-known that K<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> are taken up by roots in a similar fashion and root K<sup>+</sup> uptake systems may constitute the gate for Cs<sup>+</sup> accumulation into the plant (Collander, 1941; White & Broadley, 2000). Whether for correcting K<sup>+</sup> deficiencies or for reducing the deleterious effects of the mentioned abiotic stresses or others, the fact is that modern agriculture is based on the use of large amounts of K<sup>+</sup> fertilizers. Indeed, 40–60% of crop yields are attributable to fertilization (Stewart, Dibb, Johnston, & Smyth, 2005). This involves important economic and environmental costs and there is a need to generate crop varieties with a higher use-efficiency of K<sup>+</sup> which allow a sustainable agriculture. One of the approaches to meet this goal would be to improve root K<sup>+</sup> acquisition, which requires the characterization of the K<sup>+</sup> uptake systems of crops.

K<sup>+</sup> is taken up from the soil solution by the roots through specific transport systems located at the plasma membrane of epidermal and cortical root cells. Research in the model plant *Arabidopsis thaliana* has allowed the characterization of the main systems involved in root K<sup>+</sup> uptake and their regulatory mechanisms (Aleman, Nieves-Cordones, Martinez, & Rubio, 2011). Thus, the AtHAK5 transporter and the AKT1 channel have been described as the major contributors to root K<sup>+</sup> uptake (Rubio, Nieves-Cordones, Alemán, & Martinez, 2008). AtHAK5 is the only system mediating K<sup>+</sup> uptake at external concentrations lower than 20 μM (Nieves-Cordones, Aleman, Martinez, & Rubio, 2010; Pyo, Gierth, Schroeder, & Cho, 2010; Rubio et al., 2008). At higher concentrations, from 20 to 200 μM, both AtHAK5 and AKT1 contribute to uptake. At concentrations higher than 500 μM K<sup>+</sup>,

AtHAK5 contribution is very low and AKT1 becomes the predominant pathway for K<sup>+</sup> uptake (Pyo et al., 2010; Rubio, Alemán, Nieves-Cordones, & Martínez, 2010). It is worth to highlight that HAK5-like K<sup>+</sup> transporters have been shown to play an important role in K<sup>+</sup> nutrition under salt stress (Chen et al., 2018; Nieves-Cordones et al., 2010; Shen et al., 2015) and for plant Cs<sup>+</sup> accumulation (Nieves-Cordones et al., 2017; Rai et al., 2017). Thus, this type of transporters is interesting targets for crop biotechnology.

As more information is obtained, it is becoming clear that important differences in the functionality and regulation of HAK5-like transporters exist among species. As an example, it has been observed that AtHAK5 contribution to K<sup>+</sup> uptake is decisive at external concentrations ≤20 μM K<sup>+</sup> in *Arabidopsis* (Rubio et al., 2008) whereas the rice homolog OsHAK1 operates in a much wider range of K<sup>+</sup> concentrations (0.001–1 mM K<sup>+</sup>) (Chen et al., 2015; Nieves-Cordones et al., 2017). In addition, K<sup>+</sup> transport systems may have additional functions in crops that are absent in *Arabidopsis*. This is the case of OsHAK1 that contributes to pollen viability, fertility and plant yield (Chen et al., 2018) whereas a similar role for AtHAK5 has not been reported. In conclusion, the *Arabidopsis* model cannot be literally extended to other plant species. Thus, although research in *Arabidopsis* is still fundamental to identify the main actors and regulatory mechanisms for root K<sup>+</sup> uptake, studies in crops are necessary to weight the relative contribution of the different systems and to discover new roles of these actors.

Here we present a study on tomato plants which demonstrates the important role of the high-affinity K<sup>+</sup> transporter SIHAK5 in root K<sup>+</sup> uptake. By using CRISPR-Cas genome edition, KO *slhak5* mutant lines are obtained and characterized. The results show the crucial role of SIHAK5 for root high-affinity K<sup>+</sup> uptake, for maintaining K<sup>+</sup> nutrition and growth under K<sup>+</sup>-limiting conditions and especially if they occur under salinity as well as for the accumulation of Cs<sup>+</sup> in the plant, especially in the fruit. In addition, the results show a novel function for a HAK5-type transporter in a dicotyledonous plant with fleshy fruits because SIHAK5 is required for accumulation of K<sup>+</sup> in pollen grains, germination and tube elongation, constituting an important determinant of seed and fruit production.

## 2 | RESULTS

### 2.1 | Generation of *slhak5* KO mutants by CRISPR-Cas edition

Previous results by our group pointed to SIHAK5 as a candidate transport system involved in K<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> accumulation from diluted solutions in tomato plants (Nieves-Cordones, Martinez-Cordero, Martinez, & Rubio, 2007; Nieves-Cordones, Miller, Alemán, Martínez, & Rubio, 2008; Rodenas, Nieves-Cordones, Rivero, Martinez, & Rubio, 2018). In order to demonstrate the role of SIHAK5 in high-affinity K<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> uptake in tomato roots, the *SIHAK5* locus was edited with the CRISPR-Cas system to produce knock-out mutants. Two single-guide RNA (sgRNAs) were designed to target two genomic

DNA regions corresponding to exon 1 and exon 2 (Figure 1) at positions +147, in the non-coding strand and +1203, in the coding strand, from the ATG, respectively. The coding sequence of the two spacer regions of these sgRNAs was cloned into the same entry vector A59 (multiplex edition). Both sgRNA expression cassettes were subsequently transferred to the A60 plant expression vector and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain (both plasmids A59 and A60 are property of Abiopep Plant Health S.A.). Then, cotyledons of Micro-Tom Wild-type (WT) plants were infected with *A. tumefaciens* and independent plant lines resistant to kanamycin (the antibiotic resistance marker in the transfer DNA) were obtained.

After several transformation attempts, only eight plants were regenerated. After genotyping these plants, four of these lines contained WT alleles in the *SIHAK5* locus. The other four were edited and contained indels that resulted in *SIHAK5* open reading frame truncation and generation of KO mutants (Table 1, Figure S1). Importantly, two of these lines produced no seeds and could not be propagated. The last two lines L1 (*slhak5-1*) and L2 (*slhak5-2*) produced very few seeds and were used for further experiments. It is important to take into account that only the regenerated lines that were not edited (WT allele in the *SIHAK5* locus) produced tomato fruits and seeds to



FIGURE 1 Generation of *slhak5* KO mutants with the CRISPR-Cas system. Overview of the *SIHAK5* locus and target sites for the sgRNA-Cas9 complex. Rectangles and lines depict exons and introns in *SIHAK5* gene, respectively. Two spacer sequences were designed in silico to target the sgRNA-Cas9 complex to their corresponding targets sites (sequence provided in bold letters) in exons 1 and 2, respectively. protospacer adjacent motif (PAM) sequences are underlined

the same levels of a WT plant. By contrast, lines containing KO alleles of *SIHAK5* either produced no or very few seeds (Table 1). This suggested that the low seed production of *slhak5* lines was specific to the edition of the *SIHAK5* gene.

## 2.2 | *slhak5* plants are affected in root high-affinity K<sup>+</sup> uptake

In a first series of experiments we studied the effect of the KO *slhak5* mutation on root K<sup>+</sup> uptake (Figure S2). Rb<sup>+</sup> was used as a tracer for K<sup>+</sup> in uptake experiments at two external concentrations, 1 and 0.02 mM Rb<sup>+</sup> in K<sup>+</sup>-sufficient and -starved plants. After growing *slhak5-1* plants under control Hoagland solution containing 0.3 mM K<sup>+</sup> for 14 days, a set of plants were subjected to K<sup>+</sup> starvation by growing them for 7 days in the absence of K<sup>+</sup>. Another set remained in the complete solution with 0.3 mM K<sup>+</sup>. Then, plants were incubated for 6 hr in nutrient solution with no K<sup>+</sup>, supplemented with 1 or 0.02 mM Rb<sup>+</sup>. No differences in the dry weights of the different organs were observed between WT and *slhak5-1* plants (Figure 2a). As expected, the content of the K<sup>+</sup>-sufficient organs was higher than those of the K<sup>+</sup>-starved ones (Figure 2b). The 7-day K<sup>+</sup>-starvation treatment reduced organ K<sup>+</sup> content around 50% and no differences were observed in K<sup>+</sup> content between WT and *slhak5-1* organs (Figure 2b). Rb<sup>+</sup> uptake rates were calculated from the Rb<sup>+</sup> accumulation within the plant. It could be observed that WT and *slhak5-1* plants showed similar rates of Rb<sup>+</sup> uptake in K<sup>+</sup>-sufficient plants assayed in the presence of 1 mM Rb<sup>+</sup> (Figure 2c). When these K<sup>+</sup>-sufficient plants were assayed at 0.02 mM Rb<sup>+</sup>, lower rates of Rb<sup>+</sup> uptake than when assayed at 1 mM Rb<sup>+</sup> were observed in both lines. Importantly, the uptake rates of the *slhak5-1* line were of a lower magnitude than those of the WT plants (Figure 2c). K<sup>+</sup> starvation increased the rates of Rb<sup>+</sup> uptake in WT plants from an external concentration of 1 mM Rb<sup>+</sup> and specially from 0.02 mM external Rb<sup>+</sup> (Figure 2d). These results indicated that K<sup>+</sup> starvation induced the high-affinity component of K<sup>+</sup> uptake, in agreement with previous results on both root K<sup>+</sup> uptake and *SIHAK5* expression (Bacha et al., 2015; Nieves-Cordones et al., 2007, 2008; Rodenas et al., 2018). In the

TABLE 1 Allelic sequences of the *SIHAK5* locus at the sgRNAs target sites and number of seeds of T0 tomato plants

Line	Name	sgRNA1 target (exon 1)		sgRNA2 allele (exon 2)		Number of seeds per plant
		Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	
L1	<i>slhak5-1</i>	+1	+1	-2	-3	10
L2	<i>slhak5-2</i>	+1	+1	-2	-4	6
L3	—	+1	+1	-2	-4	0
L4	—	+1	+1	-2	-3	0
L5	—	WT		WT		152
L6	—	WT		WT		66
L7	—	WT		WT		281
L8	—	WT		WT		214

Note: Positive values and negative values depict the number of bp inserted or deleted, respectively, in the *SIHAK5* locus.

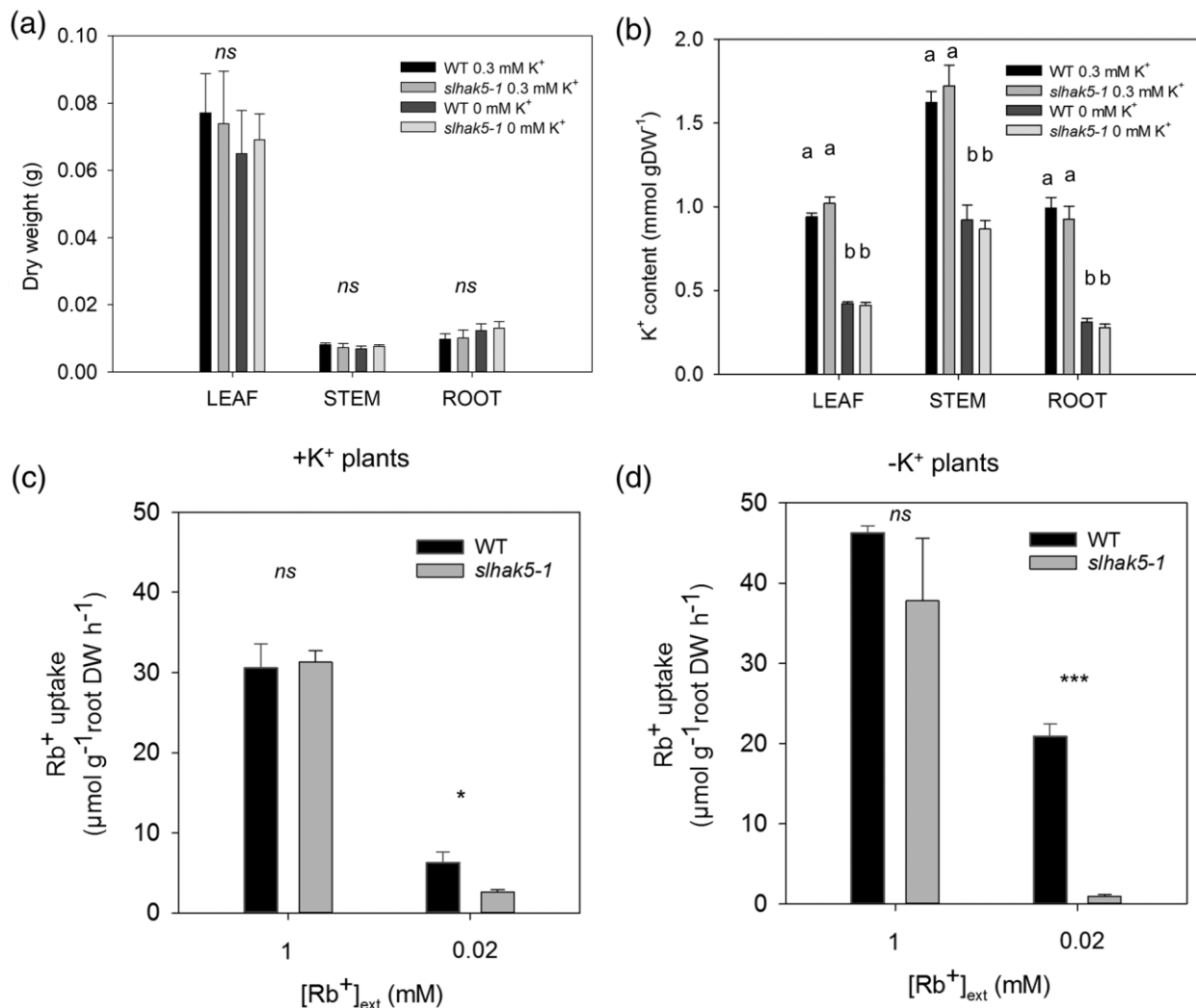


FIGURE 2 Organ dry weight, K<sup>+</sup> content and high-affinity K<sup>+</sup> uptake in K<sup>+</sup>-starved WT and *slhsk5-1* plants. Plants of the WT and *slhsk5-1* lines were grown for 14 days in complete Hoagland solution containing 0.3 mM K<sup>+</sup>. Then, a set of plants were grown for 7 days in solution with no K<sup>+</sup> and another set remained in the complete solution. After this growth period, plants were transferred to solution with no added K<sup>+</sup> and 0.02 mM or 1 mM RbCl (as indicated) for 6 hr and then separated in roots, stems and leaves, dried. Four days later their dry weight was determined. After acid digestion, the internal K<sup>+</sup> and Rb<sup>+</sup> content in tissues were determined. (a) Dry weight of leaves, stems and roots. (b) K<sup>+</sup> content of leaves, stems and roots. (c, d) Rb<sup>+</sup> uptake rates of in K<sup>+</sup>-sufficient (c) and K<sup>+</sup>-starved (d) plants at 1 and 0.02 mM Rb<sup>+</sup>. Data are mean values (n = 5) ± SE, and bars with different letters are significantly different at p < .05 according to Tukey's test. ns denotes not significant. \* and \*\*\* indicate p < .05 and p < .001 in Student's t test, respectively

presence of 1 mM Rb<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-starved *slhsk5-1* plants showed a value of Rb<sup>+</sup> uptake rate close to that of WT plants (Figure 2d). However, at 0.02 mM external Rb<sup>+</sup>, the *slhsk5-1* line did not show the observed increase of Rb<sup>+</sup> uptake displayed by K<sup>+</sup>-starved WT plants. Indeed, under these conditions, the *slhsk5-1* line showed a 22-fold lower rate of Rb<sup>+</sup> uptake than WT plants (Figure 2d). These results showed that SIHAK5 was required by tomato plants for K<sup>+</sup> uptake in the high-affinity range of concentrations. Rb<sup>+</sup> uptake in the high-affinity range of concentrations was also studied in K<sup>+</sup>-starved plants of the *slhsk5-2* line, which produced similar results to *slhsk5-1* plants (Figure S3).

*slhsk5*-edited plants produced a very low number of seeds (seeds per plant, Table 1). This precluded a comprehensive kinetic characterization of the effect of the mutation on high-affinity K<sup>+</sup> uptake either

in short-term Rb<sup>+</sup> uptake or in long-term K<sup>+</sup> accumulation experiments. Therefore, the root cell plasma membrane depolarization produced by increasing external K<sup>+</sup> concentration was used as an alternative approach. As described previously, membrane depolarization induced by increasing external K<sup>+</sup> concentration can be used as a measurement of the K<sup>+</sup> uptake capacity of root cells (Spalding et al., 1999). WT and *slhsk5-1* epidermal and cortical root cells of K<sup>+</sup>-starved plants were impaled with electrodes and the membrane potential response to changes in external K<sup>+</sup> determined. It was observed that increasing external K<sup>+</sup> produced much higher membrane potential depolarizations in WT roots than in *slhsk5-1* roots, except at 0.5 mM K<sup>+</sup>, concentration at which similar depolarizations were observed in both lines (Figure 3, Figure S2). The depolarizations



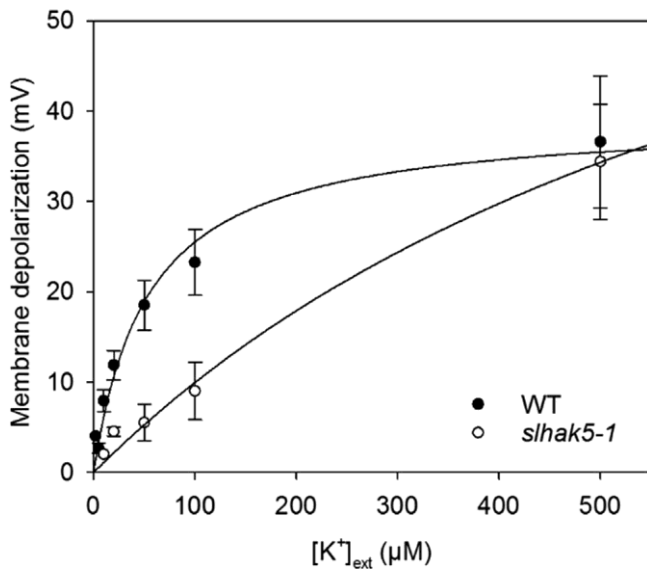


FIGURE 3 Root cell plasma membrane depolarizations induced by  $K^+$  in WT and *slhak5-1* plants. Epidermal and cortical root cells of WT and *slhak5-1* seedlings germinated in water for 10 days were impaled with microelectrodes and their membrane potential registered with an electrometer. Roots were perfused with a solution containing 0.5 mM  $CaCl_2$  buffered to pH 6 (10 mM MES/Bis-Tris) and different amounts of KCl to reach the indicated concentrations. Plasma membrane depolarizations induced by external  $K^+$  were plotted versus the external  $K^+$  concentration. Data were fitted to Michaelis-Menten kinetics ( $R^2$  were .96 and .99 for WT and *slhak5-1* data, respectively). Data are mean values of at least three repetitions and error bars denote SE

were plotted versus the external  $K^+$  concentrations and the data fitted to Michaelis-Menten equations due to the enzyme kinetics-like behaviour of these measurements (Nieves-Cordones et al., 2017). Kinetic parameters were determined and they showed that in WT plants the depolarizations supported the existence of a  $K^+$  uptake component with an apparent  $K_m$  of  $26.4 \pm 5.2 \mu M K^+$  whereas in the *slhak5-1* line that component showed a  $K_m$  of  $775 \pm 15.9 \mu M$ . The higher  $K_m$  values in *slhak5-1* roots indicate a lower capacity to take up  $K^+$  at low external  $K^+$  concentrations in comparison to WT roots.

### 2.3 | SIHAK5 is required for $K^+$ uptake to sustain plant growth under $K^+$ -limiting conditions in the absence and in the presence of salinity

A long-term growth experiment at limiting external  $K^+$  was performed (Figure S2). Plants of the WT and the *slhak5-1* lines were grown for 7 days in a complete solution with 1.4 mM  $K^+$ . Then they were transferred for 14 days to a solution containing 0.01 mM  $K^+$ , a concentration where SIHAK5 is expected to have a prominent role in  $K^+$  uptake according to  $Rb^+$  uptake experiments (Figures 2 and 3). In parallel, a set of plants were grown with 50 mM NaCl in the nutrient solution to

impair  $K^+$  uptake (external ratio  $Na^+:K^+$  5,000:1) (Nieves-Cordones et al., 2010).

*slhak5-1* plants grown with 0.01 mM  $K^+$  were much smaller than WT plants both in the absence and presence of 50 mM  $Na^+$  (Figure 4a). Importantly, shoots of *slhak5-1* showed chlorosis symptoms characteristic of  $K^+$  deficiency. Root and leaf dry weight of *slhak5-1* plants grown under 0.01 mM  $K^+$  were about one-third the weights of those organs of WT plants, whereas stems dry weight were similar in both plant lines (Figure 4b). It is worth to highlight that the presence of 50 mM  $Na^+$  in WT plants grown under 0.01 mM  $K^+$  increased tissue dry weight. However, this beneficial effect of  $Na^+$  was barely observed in *slhak5-1* plants. Thus, while the presence of  $Na^+$  increased the dry weight of WT plants a 53%, it only increased a 9% that of *slhak5-1* plants. This indicated that SIHAK5  $K^+$  uptake activity was required to benefit from the additional  $Na^+$  supply.

$K^+$  content in roots, stems and leaves of these plants were determined. In general, the  $K^+$  contents of *slhak5-1* organs were about 50% lower than those of WT ones (Figure 4c). The presence of 50 mM  $Na^+$  reduced internal  $K^+$  content and this effect was of a similar magnitude in both plant lines. It could be observed that, with the exception of a lower  $Na^+$  content in *slhak5-1* stems of plants exposed to 50 mM  $Na^+$ , both plant lines showed similar  $Na^+$  content in their organs (Figure S4a). Thus, the  $K^+/Na^+$  ratios of plants grown in the presence of 50 mM  $Na^+$  were higher in leaves and roots of WT plants than in those of *slhak5-1* plants (Figure S4b).

The plants subjected to the described treatments were assayed for  $Rb^+$  uptake from a 0.02 mM solution. WT plants grown in the absence of  $Na^+$  showed a  $23.2 \pm 1.5 \mu mol Rb^+ g^{-1} rootDW hr^{-1}$   $Rb^+$  uptake rate, while  $Rb^+$  uptake in *slhak5-1* plants was almost negligible, showing a rate of  $0.68 \pm 0.07 \mu mol Rb^+ g^{-1} rootDW hr^{-1}$  (Figure 4d). These uptake rates of plants grown continuously with 0.01 mM  $K^+$  were in agreement with those shown by  $K^+$  starved plants (Figure 2d). The presence of 50 mM  $Na^+$  reduced about 50% the rate of  $Rb^+$  uptake in WT plants whereas had no effect on *slhak5-1* plants (Figure 4d). This is in conformity with the reported SIHAK5 expression pattern, induced by  $K^+$  starvation and repressed by the presence of NaCl (Nieves-Cordones et al., 2007, 2008; Rodenas et al., 2018). All together, these results demonstrated the important role of SIHAK5 for  $K^+$  uptake from diluted solutions (Figure 4d) to sustain plant growth (Figure 4a,b). Importantly, the results show that, although the presence of 50 mM NaCl reduced  $K^+$  uptake, SIHAK5 constitutes the only system mediating  $K^+$  uptake at an external concentration of 0.01 mM (Figure 4d).

### 2.4 | *slhak5* plants show reduced $Cs^+$ uptake and accumulation

$Cs^+$  accumulation in plants has been related to the activity of HAK5-like transporters in roots and in a previous report SIHAK5 has been proposed to be the major contributor for  $Cs^+$  accumulation within the plant (Rodenas et al., 2018). In order to clarify the contribution of

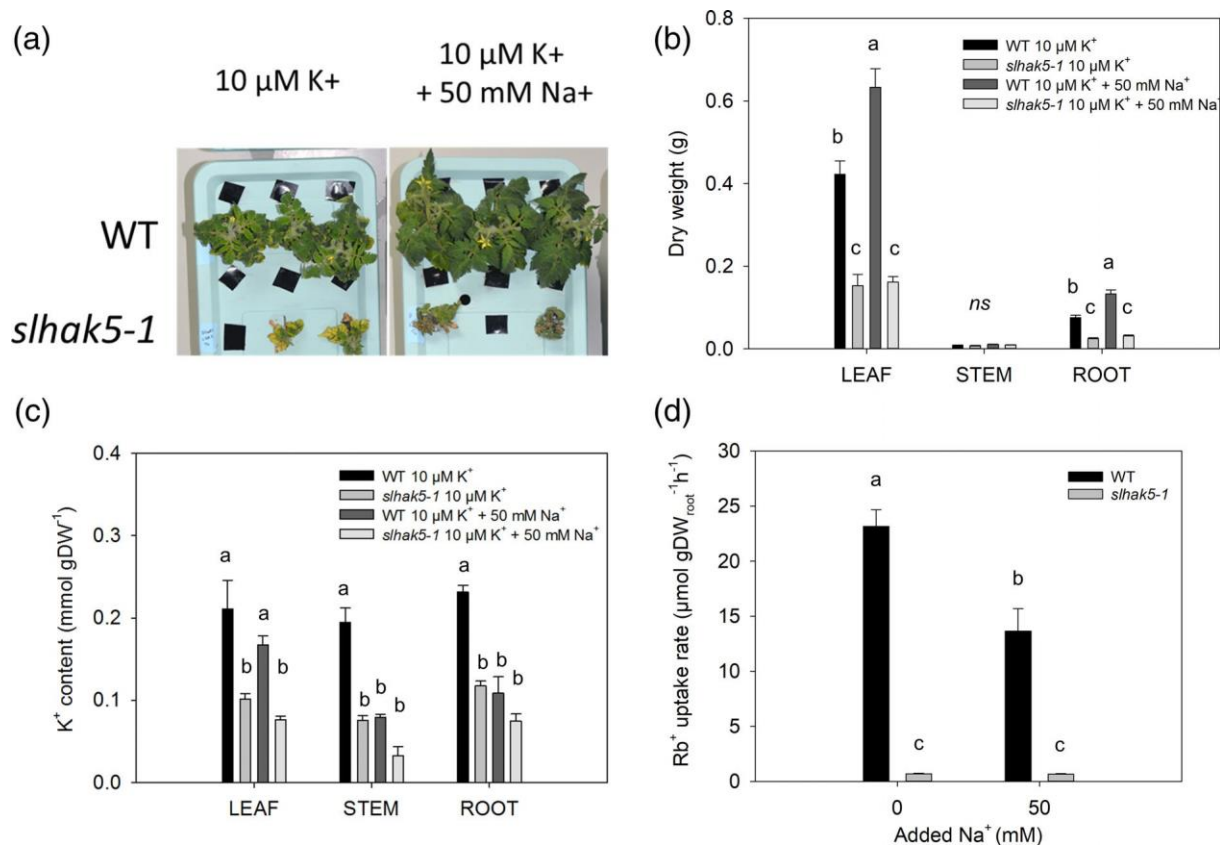


FIGURE 4 Pictures, organ dry weight,  $\text{K}^+$  content and high-affinity  $\text{Rb}^+$  uptake of WT and *slhak5-1* plants grown with 0.01 mM  $\text{K}^+$  in the absence and the presence of 50 mM NaCl. Plants of the WT and *slhak5-1* line were grown for 7 days in nutrient solution containing 1.4 mM  $\text{K}^+$  and then transferred to solution containing 0.01 mM  $\text{K}^+$  in the absence or the presence of 50 mM NaCl during 14 days. (a) Pictures of plants at the end of the experiment, (b) organ dry weight, (c) internal  $\text{K}^+$  content and (d)  $\text{Rb}^+$  uptake rates when incubated 6 hr in the presence of 20  $\mu\text{M}$   $\text{RbCl}$ . Data are mean values ( $n = 4-6$ )  $\pm$  SE, and bars with different letters are significantly different at  $p < .05$  according to Tukey's test. ns denotes not significant

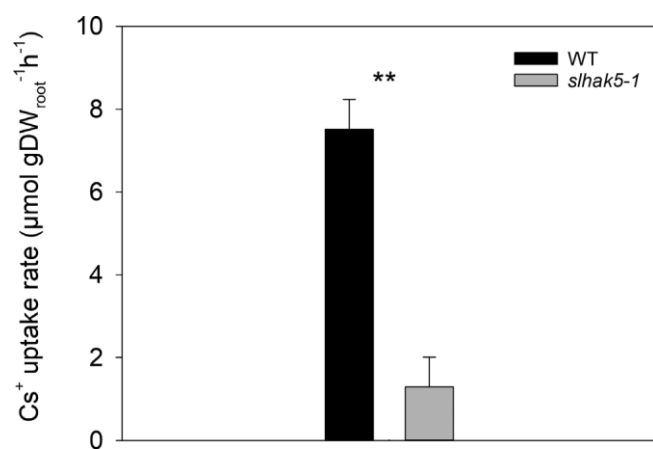
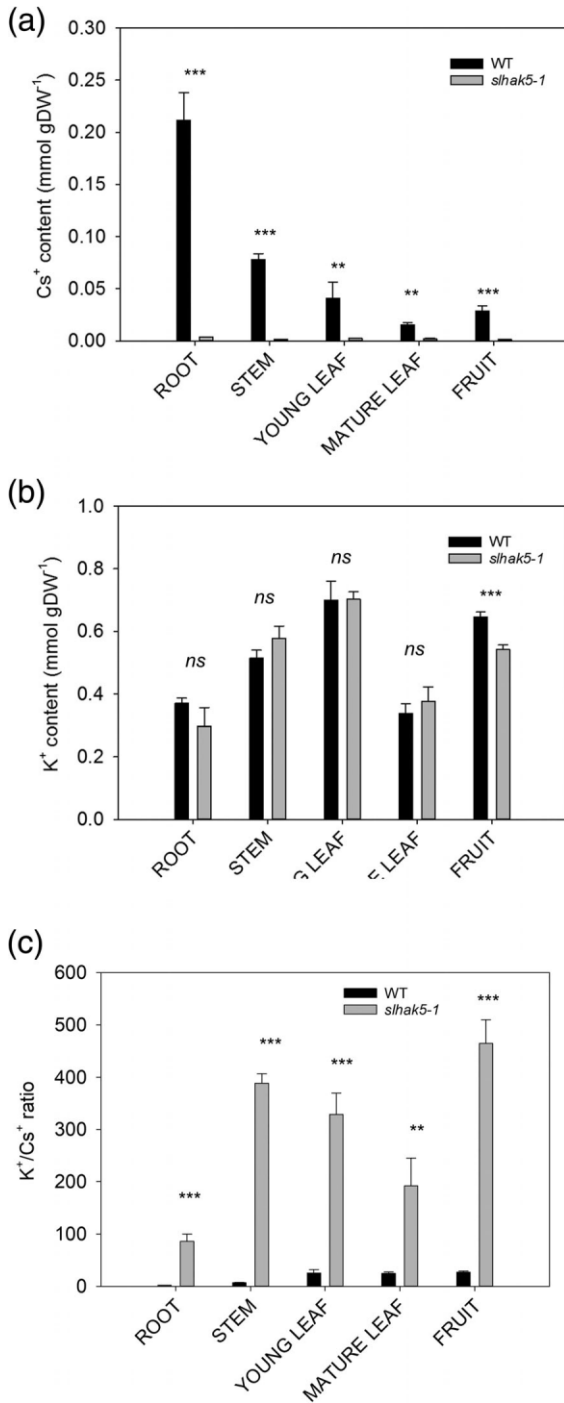


FIGURE 5  $\text{Cs}^+$  uptake rates from 0.02 mM external  $\text{Cs}^+$  solution in  $\text{K}^+$ -starved plants. Plants of the WT and *slhak5-1* lines were grown and starved of  $\text{K}^+$  as indicated in Figure 2. Then, plants were transferred to a solution with no added  $\text{K}^+$  in the presence of 0.02 mM  $\text{CsCl}$  for 6 hr. After this, plant material was harvested and processed to determine the rates of  $\text{Cs}^+$  uptake. Data are mean values  $\pm$  SE and \*\* indicates  $p < .01$  in Student's  $t$  test

SIHAK5 in this process,  $\text{K}^+$ -starved plants were assayed for  $\text{Cs}^+$  uptake from a 0.02 mM solution (Figure S2). The results obtained clearly showed that  $\text{Cs}^+$  uptake rates were lower in *slhak5-1* plants in comparison to those of WT plants ( $1.29 \pm 0.72 \mu\text{mol Cs}^+ \text{g}^{-1} \text{rootDW} \text{hr}^{-1}$  vs.  $7.52 \pm 0.72 \mu\text{mol Cs}^+ \text{g}^{-1} \text{rootDW} \text{hr}^{-1}$ , respectively; Figure 5).

Another experiment was designed to study  $\text{Cs}^+$  accumulation in different plant organs and importantly in fruits. The latter aspect is of crucial importance in  $\text{Cs}^+$ -contaminated agricultural lands where fruit commercialization may not be allowed due to a high  $\text{Cs}^+$  content. Plants were grown in a solution containing 0.3 mM  $\text{K}^+$  and 0.02 mM  $\text{Cs}^+$  for 90 days (Figure S2). It was observed that *slhak5-1* plants accumulated much less  $\text{Cs}^+$  in their organs than WT plants (Figure 6a). The  $\text{Cs}^+$  content was 61-, 52-, 18-, 7- and 22-fold higher in WT roots, stems, young leaves, mature leaves and fruits, respectively, than in *slhak5-1* ones (Figure 6a). The  $\text{K}^+$  content of plant organs did not show differences between the two lines, except in fruits (Figure 6b). Therefore, the  $\text{K}^+/\text{Cs}^+$  ratios were much higher in *slhak5-1* than in WT plants, indicating a higher discrimination between  $\text{K}^+$  over  $\text{Cs}^+$  in plants lacking SIHAK5 (Figure 6c). The  $\text{Cs}^+$  transfer factors ( $\text{TF}_{\text{fruit}}$ ) from the external solution to the fruit were calculated and important differences between WT and mutant plants were observed. While



**FIGURE 6** Cs<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> content and K<sup>+</sup>/Cs<sup>+</sup> ratios in organs of plants grown in the presence of 0.3 mM K<sup>+</sup> and 0.02 mM Cs<sup>+</sup>. Plants of the WT and *slhak5-1* lines were grown for 90 days in a solution containing 0.3 mM K<sup>+</sup> and 0.02 mM CsCl to allow fructification and fruit harvests. After this, organs were harvested and processed to determine their internal (a) Cs<sup>+</sup> and (b) K<sup>+</sup> content. (c) The internal K<sup>+</sup>/Cs<sup>+</sup> ratios were calculated. Data are mean values ( $n = 3$ )  $\pm$  SE. \*\* and \*\*\* indicate  $p < .01$  and  $p < .001$ , respectively, in Student's *t* test. ns denotes not significant

WT plants showed a  $TF_{\text{fruit}}$  of  $151.6 \pm 28$ , *slhak5-1* plants showed a  $TF_{\text{fruit}}$  of  $8.5 \pm 0.7$ . It is worth to mention that the lower  $TF_{\text{fruit}}$  of *slhak5-1* plants was achieved without affecting plant K<sup>+</sup> content.

## 2.5 | *slhak5* plants showed reduced fruit and seed production

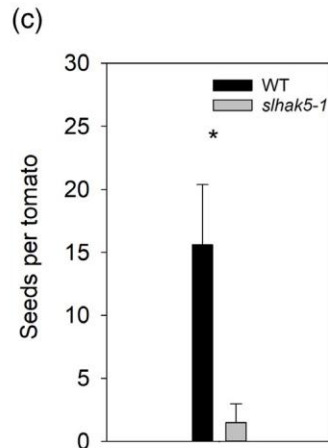
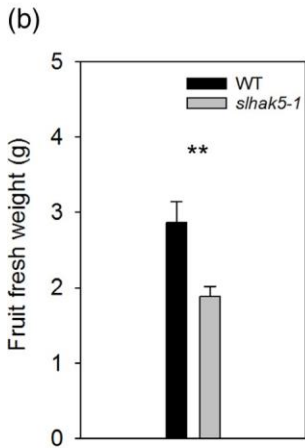
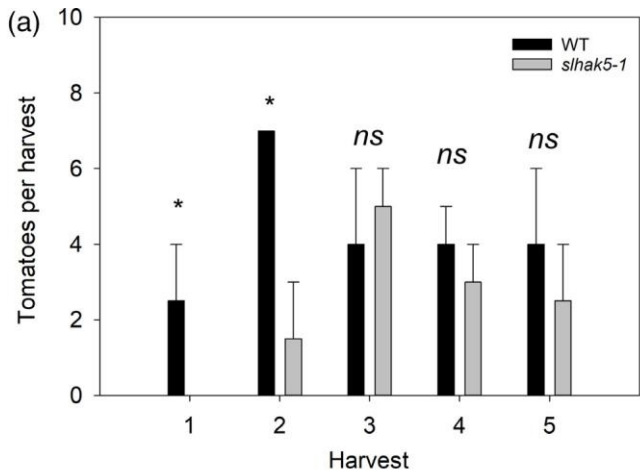
As indicated above, the CRISPR-Cas edited KO *slhak5* plants produced tomato fruits with very few seeds in comparison to WT plants (Table 1). This effect suggests that SIHAK5 may play a role on fruit physiology, which was further studied. Plants were grown in K<sup>+</sup> sufficient (1.4 mM K<sup>+</sup>) nutrient solution until fructification (Figure S2). Tomato fruits were harvested at different time points as they ripen (five harvests in total). Fruit production was delayed in *slhak5-1* in relation to WT plants (Figure 7a). At the date of the first fruit harvest in WT plants, no tomato fruits could be collected in the *slhak5-1* line. In addition, the average weight of *slhak5-1* tomatoes was lower than that of WT plants (Figure 7b). As a consequence, the total fruit yield was lower in the *slhak5-1* line than in the WT ( $22.6 \pm 3.0$  g of tomatoes per plant for *slhak5-1* vs.  $51.6 \pm 9.7$  g for WT). Moreover, the number of seeds per tomato fruit was much smaller in *slhak5-1* plants, with  $1.5 \pm 1.5$  seeds per tomato in comparison with the  $15.6 \pm 4.8$  seeds per tomato in WT plants (Figure 7c,d).

## 2.6 | SIHAK5 is expressed in stamens and pistils

The reduced fruit and seed production of the *slhak5* lines (Table 1, Figure 7) suggested that SIHAK5 may play a role in a process directly related to ovule fertilization. Therefore, the expression of SIHAK5 in different plant and flower organs was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Plants were grown under K<sup>+</sup> sufficient supply (1.4 mM K<sup>+</sup>) until flowering and samples of roots, stems, leaves, sepals, petals, stamens and pistils were collected to determine SIHAK5 mRNA levels (Figure S2). qPCR results showed that SIHAK5 was preferentially expressed in roots followed by stamens and pistils, and that its expression was the lowest in leaves and stems (Figure 8).

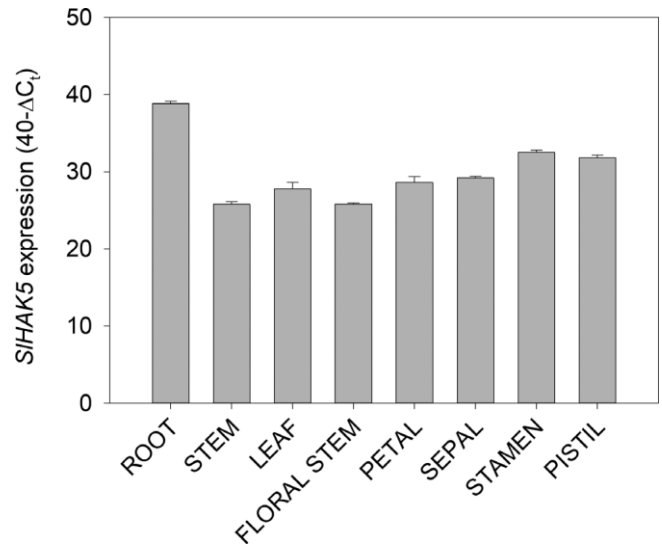
## 2.7 | Pollen germination and pollen tube growth were importantly impaired in *slhak5* plants

Ovule fertilization and seed development directly depend on the germination and tube growth of pollen grains (Wilhelmi & Preuss, 1999). Because the *slhak5* lines were affected in seed production (Table 1) and SIHAK5 was expressed in stamens (Figure 8), the effect of the *slhak5-1* mutation on pollen physiology was studied (Figure S2). Germination of pollen grains from WT and *slhak5-1* plants was determined on a microscope slide covered with minimal media that contained no added K<sup>+</sup> ( $[K^+]_{\text{ext}} \approx 100 \mu\text{M}$ ), or that was supplemented with 1 or 5 mM K<sup>+</sup>. Pollen grains were sprinkled on that media and incubated for 4 hr. At first sight, it could be observed that few *slhak5-1* pollen grains germinated and many looked flaccid and wrinkled while most of WT ones had germinated and were rounded and turgid (Figure 9a,b). It could be observed that around 50% of WT pollen grains germinated and that increasing K<sup>+</sup> slightly increased the



**FIGURE 7** Number of tomato fruits harvested, plant yield and seeds per tomato of WT and *slhak5* plants. Plants of the WT and *slhak5-1* lines were grown in the presence of 1.4 mM K<sup>+</sup> until fructification. Tomato fruits were harvested at different time points. (a) Number of tomato fruits per harvest (1, 2, 3, 4 and 5 denote 90, 97, 106, 118 and 129 days after germination) of three plants for each line. (b) Average fruit fresh weight of WT and *slhak5-1* plants. (c) Average number of seeds per tomato in WT and *slhak5-1* plants. Data are mean values  $\pm$  SE and \* and \*\* indicate  $p < .05$  and  $p < .01$ , respectively, in Student's *t* test. ns denotes not significant.  $n = 3$  for plant tissues and  $n = 15$  for fruits. (d) Photographs of WT and *slhak5-1* tomatoes. Scale bar = 1 cm [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

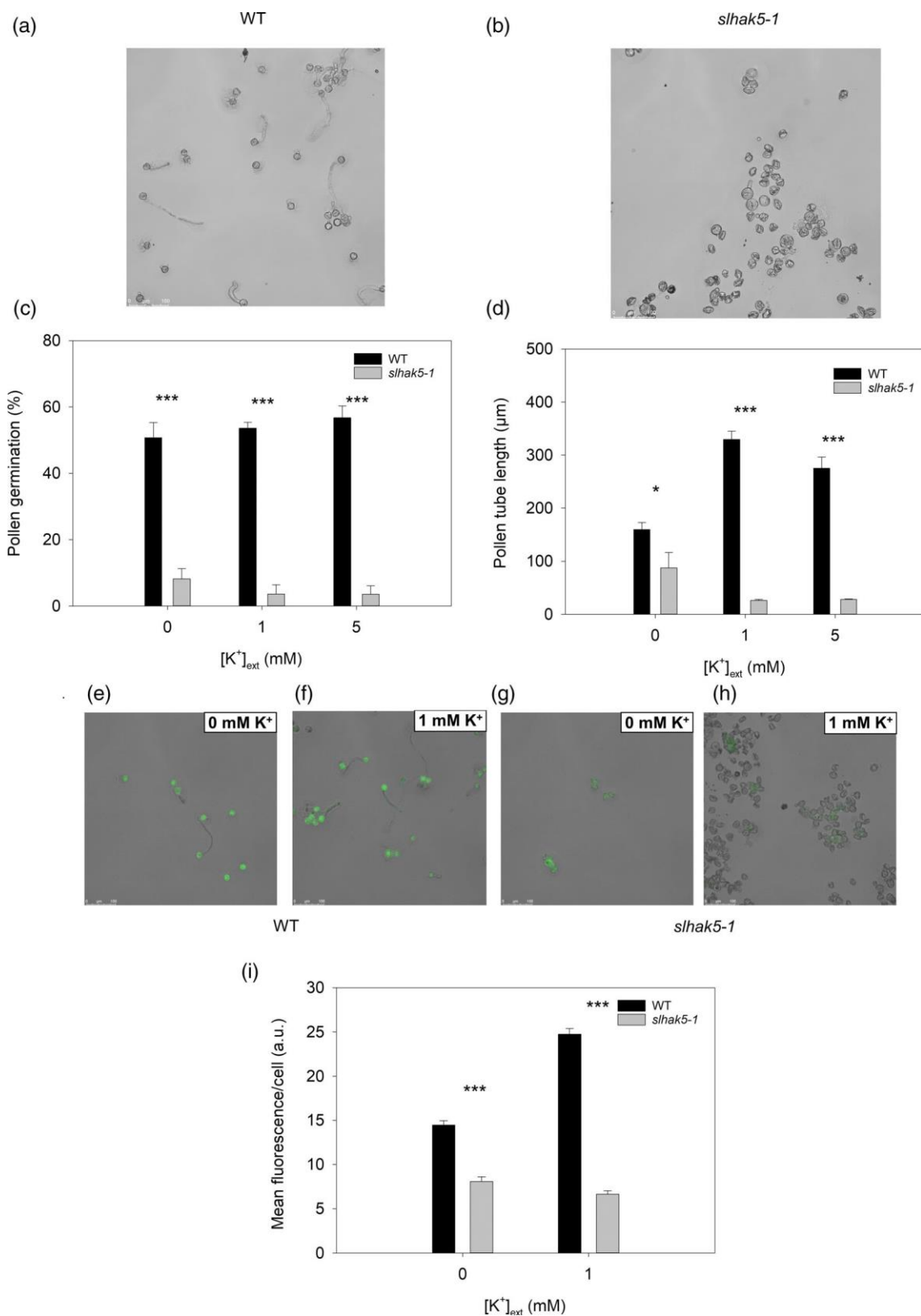
germination rate, although this K<sup>+</sup> effect was not significant (Figure 9c). By contrast, less than a 10% of the *slhak5-1* pollen grains germinated and increasing the K<sup>+</sup> concentration of the germination media did not increase their germination rate but rather it decreased



**FIGURE 8** Relative expression levels of *SIHAK5* in different organs of WT plants. Plants of the WT line were grown in the presence of 1.4 mM K<sup>+</sup> until fructification. Plants were separated in the indicated plants organs, their RNA isolated and reverse transcribed. Real-time PCR was used to determine relative expression levels of *SIHAK5* with respect to the endogenous gene (*SIEF1α*). Relative expression levels are given as  $40 - \Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct_{SIHAK5} - Ct_{SIEF1\alpha}$ ). Data are means of three biological replicates and error bars denote SE

it (Figure 9c). Then, length of pollen tubes 4 hr after germination was determined. In the absence of added K<sup>+</sup>, the tube length of WT grains was larger than that of *slhak5-1* grains (Figure 9d). Increasing external K<sup>+</sup> importantly increased the tube length of WT pollen grains. By contrast, K<sup>+</sup> addition had no effect on tube length of *slhak5-1* grains. Germination rates and pollen tube lengths were also determined in pollen grains from the *slhak5-2* line. In addition, pollen from a descendant of the *slhak5-1* line, which lacked the T-DNA cassette, was also characterized (Figure S5). The germination rates and pollen tube lengths of these two lines were comparable to those shown in Figure 9c,d for *slhak5-1* pollen, and gave further support to the idea that the mutation in *SIHAK5* gene was related to poor pollen performance of *slhak5* plants.

The observed phenotypes of pollen could be due to different concentrations of K<sup>+</sup> within pollen grains during germination and tube elongation. Thus, the relative K<sup>+</sup> concentration of pollen was estimated by using the K<sup>+</sup>-sensitive fluorescent dye Ion Potassium Green 4 (IPG-4). Pollen grains were germinated in the absence of added K<sup>+</sup> and in the presence of 1 mM K<sup>+</sup> with IPG-4. It was observed that in the absence of added K<sup>+</sup>, the fluorescence of WT pollen grains was higher than that of *slhak5-1* ones. When the K<sup>+</sup> of the germination medium was increased to 1 mM, the internal fluorescence of WT pollen grains increased about 1.7-fold whereas that of *slhak5-1* grains was not affected. These results showed that WT pollen grains contained higher K<sup>+</sup> concentrations than *slhak5-1* pollen grains and that the WT pollen grains were able to take up K<sup>+</sup> from the external medium whereas *slhak5-1* ones did not. Similarly, IPG-4 fluorescence



**FIGURE 9** Pictures of pollen and germination rates, tube length and relative K<sup>+</sup> concentrations of pollen grains from the WT and *slhak5-1* lines. Pollen of the (a) WT and (b) *slhak5-1* lines were sprinkled on germination media with no K<sup>+</sup> added ([K<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> ≈ 100 μM) or with 1 or 5 mM KCl added ([K<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> = 1 or 5 mM) and observed 4 hr later under microscope to determine different parameters. (a) and (b) pictures of WT and *slhak5-1* pollen, respectively. (c) Germination rate of pollen grains. (d) Pollen tube length. (e–h) Pictures of (e–f) WT and (g–h) *slhak5-1* pollen germinated on media with (e and g) no K<sup>+</sup> added or (f and h) 1 mM K<sup>+</sup> added, containing the K<sup>+</sup>-sensitive fluorescence dye Ion K<sup>+</sup> green 4 (IPG-4) observed under an epifluorescence microscope. (i) Relative IPG-4 fluorescence of WT and *slhak5-1* pollen grains at two levels of external K<sup>+</sup>. Data are average ± SE of at least 200 pollen grains per each line. \* and \*\*\* indicate  $p < .05$  and  $p < .001$ , respectively, in Student's *t* test [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

was lower in *slhak5-2* and *slhak5-1* (no T-DNA) pollen grains in comparison to the WT ones indicating a lower K<sup>+</sup> concentration in these mutant lines (Figure S5c).

### 3 | DISCUSSION

Root K<sup>+</sup> uptake in tomato plants has been studied so far by indirect approaches (i.e., pharmacology of K<sup>+</sup> uptake properties) (Bacha et al., 2015; Nieves-Cordones et al., 2007, 2008; Rodenas et al., 2018) and a genetic proof of the individual contribution of candidate K<sup>+</sup> transport systems was pending. Here we showed by using *slhak5* KO mutant lines obtained with CRISPR-Cas that SIHAK5 is the major contributor to root K<sup>+</sup> uptake from diluted solutions. This information was obtained from the phenotypes of *slhak5* plants with three different approaches: Rb<sup>+</sup> uptake assays (Figure 2 and Figure S3), K<sup>+</sup>-induced depolarizations of root cell plasma membrane (Figure 3) and plant growth and plant K<sup>+</sup> concentrations at a fixed external K<sup>+</sup> concentration (Figure 4). These approaches have also allowed the establishment of a range of external K<sup>+</sup> concentrations and plant growth conditions where SIHAK5 is the major K<sup>+</sup> uptake system at the root. In K<sup>+</sup> starved plants, SIHAK5 is responsible for most of K<sup>+</sup> uptake observed at external concentrations below 300 μM (Figures 2-4 and Figure S3). In relation to this, it is worth to highlight the negative impact that the *slhak5* mutation had on long-term plant growth at 0.01 mM K<sup>+</sup> (Figure 4a-c). Interestingly, if *slhak5-1* plants were grown under K<sup>+</sup>-sufficient conditions and then starved of K<sup>+</sup> for 7 days, the K<sup>+</sup>-deficiency phenotype was not observed (Figure 1a,b), probably due to the K<sup>+</sup> reserves that plants had at the end of the K<sup>+</sup> sufficiency period. Thus, the contribution of SIHAK5 to K<sup>+</sup> nutrition in K<sup>+</sup>-deficient plants depends on the duration of the low-K<sup>+</sup> period and on plant age, being seedlings more vulnerable to low K<sup>+</sup> stress than adult plants.

When comparing our results with *slhak5* plants with those obtained in *Arabidopsis* and rice with *athak5* and *oshak1* plants, it was evident that remarkable differences in the contribution of HAK5-like transporters to K<sup>+</sup> uptake exist among these species. Here we show (Figures 2d and 3) that the upper limit for the contribution of SIHAK5 to K<sup>+</sup> uptake in tomato plants seems to be located between those for AtHAK5 (<100–200 μM K<sup>+</sup>) and OsHAK1 (>1 mM K<sup>+</sup>) in *Arabidopsis* and rice, respectively (Chen et al., 2015; Nieves-Cordones et al., 2017; Rubio et al., 2010, 2020). Because HAK5-type transporters are considered K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> symporters (Rodríguez-Navarro, 2000), a more general conclusion is that K<sup>+</sup> uptake energization probably differs among land plants. Thus, while some species rely to a higher extent on H<sup>+</sup>-coupled K<sup>+</sup> uptake (such as rice and tomato), others preferentially use channel-mediated K<sup>+</sup> uptake (such as *Arabidopsis*). Thus, it remains to be assessed the relevance of these two types of K<sup>+</sup> transport systems in a given species in relation to energy requirements, plant acclimation to changing environments and, in general, for different crops and agriculture.

It is well known that, to some extent, Na<sup>+</sup> may complement K<sup>+</sup> when plants face K<sup>+</sup> deprivation (i.e., as osmoticum in the vacuole)

improving plant growth (Horie et al., 2007; Maathuis & Sanders, 1993; Wakeel, Farooq, Qadir, & Schubert, 2011). WT plants grown with 50 mM Na<sup>+</sup> + 0.01 mM K<sup>+</sup> were larger than plants grown without Na<sup>+</sup> (Figure 4a,b) despite those plants had lower tissue K<sup>+</sup> content than WT plants grown without Na<sup>+</sup> (Figure 4c). Interestingly, SIHAK5 activity was required to benefit from this positive effect of Na<sup>+</sup> because growth of *slhak5-1* plants was similar in the absence and in the presence of Na<sup>+</sup> (Figure 4b). The relevance of high K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios for plant salt tolerance has been widely reported (Niu, Bressan, Hasegawa, & Pardo, 1995; Wu, Zhang, Giraldo, & Shabala, 2018). Importantly, although the presence of Na<sup>+</sup> reduced high-affinity K<sup>+</sup> uptake (Figure 4c) the results show that SIHAK5-mediated K<sup>+</sup> uptake was required to maintain plant growth (Figure 4b) and internal K<sup>+</sup> content (Figure 4c). Thus, SIHAK5 is not only crucial for K<sup>+</sup> nutrition at low K<sup>+</sup> but also to benefit from the physiological substitution of K<sup>+</sup> by Na<sup>+</sup>. In other words, plant growth requires a minimum K<sup>+</sup> content in plant tissues and, under low K<sup>+</sup> supply, this minimum value is ensured by SIHAK5 function. Our results point to a similar role of SIHAK5 in tomato to that of AtHAK5 in *Arabidopsis*, species in which the transporter was also required to support plant growth under low K<sup>+</sup> plus salinity conditions (Nieves-Cordones et al., 2010).

Production of low-Cs<sup>+</sup> crops in lands affected by nuclear accidents has become a challenge for farmers. It is not a matter of toxicity for crops since radiocaesium concentrations in these scenarios is in the low micromolar range or below (Burger & Lichtscheidl, 2018). On the contrary, it is a problem for people and cattle that eat the radioactive plant material. Radiocaesium can reach crop roots when deposited in the soil or when moved to continental water and thus present in the irrigation water or in hydroponics systems (Nagao et al., 2013; Yasutaka, Miyoshi, & Ito, 2014). At these low concentrations, radiocaesium is rapidly absorbed by plant roots and may be accumulated in edible organs, so Cs<sup>+</sup> uptake is a critical process to reduce its accumulation in the plant. Engineering plants with a low-Cs<sup>+</sup> uptake capacity is a promising approach since the alternative solutions, which are the increase of K<sup>+</sup> fertilizer inputs or removal of Cs<sup>+</sup>-containing soil layers, have been shown to be hazardous and expensive (Fujimura et al., 2016; Lepage et al., 2015; Ohmori et al., 2014; Sakai, Gomi, Nunokawa, Wakahara, & Onda, 2014; Wakabayashi et al., 2016). HAK5-like transporters such as AtHAK5 and OsHAK1 have been shown to constitute important pathways for Cs<sup>+</sup> accumulation in *Arabidopsis* and rice, especially in K<sup>+</sup>-deprived plants (Genies et al., 2017; Nieves-Cordones et al., 2017; Qi et al., 2008; Rai et al., 2017). A recent pharmacological study suggested that the same might be true for SIHAK5 and tomato plants (Rodenas et al., 2018). Importantly, this low accumulation of Cs<sup>+</sup> also occurred in *slhak5-1* fruits, which are the edible and commercially-relevant part of the plant, that showed a very low Cs<sup>+</sup> transfer factor (TF<sub>fruit</sub> = 8.5 ± 0.7) in comparison to WT fruits (TF<sub>fruit</sub> = 151.6 ± 28). It is worth to highlight that the growth conditions used (300 μM K<sup>+</sup> + 0.02 mM Cs<sup>+</sup>) gave rise to much lower Cs<sup>+</sup> contents in *slhak5-1* plants (Figure 6a) without remarkable effects in the tissue K<sup>+</sup> content (Figure 6b). Nevertheless, *slhak5-1* plants were prone to have smaller fruits than WT plants (Figure 7b), so it would be desirable to separate the contribution of SIHAK5 to root

Cs<sup>+</sup> uptake from its contribution to fruit development. One approach would be to replace native SIHAK5 with allelic variants with improved K<sup>+</sup>/Cs<sup>+</sup> selectivity which would maintain the K<sup>+</sup> transport function, especially in reproductive organs, while reducing root Cs<sup>+</sup> uptake. For example, the F130S mutant of AtHAK5 exhibits a higher K<sup>+</sup>/Cs<sup>+</sup> selectivity than the native transporter without penalizing its K<sup>+</sup> transport activity (Aleman et al., 2014).

As stated above, the *slhak5* mutation had deleterious effects on fruit and seed production. These effects were not related to a deficient K<sup>+</sup> nutrition of the plant, because under K<sup>+</sup> sufficient conditions, WT and *slhak5-1* plants showed similar K<sup>+</sup> content (Figure 2b) but a reduced number of fruits and seeds (Figure 7b,c). The reason behind the reduced number of tomato fruits and seeds in the *slhak5* lines (Table 1) may be a defective ovule fertilization. It has been shown that factors that improve pollination increase tomato fruit production and quality (Franceschinelli et al., 2013) and the reduced germination rate (Figure 9c) and tube growth (Figure 9d) of *slhak5-1* pollen grains would result in a reduction of ovule fertilization. Taking into account that the gene encoding SIHAK5 was expressed in reproductive organs, in particular in stamens (Figure 8), it is very likely that SIHAK5 plays a direct role in pollen physiology. Maintaining K<sup>+</sup> homeostasis is crucial for pollen viability and pollen tube elongation (Fan, Wang, Wang, & Wu, 2001; Mähs et al., 2013). K<sup>+</sup> accumulation in pollen grains is necessary for building up enough turgor pressure which allows the pollen tube to elongate (Weisenseel & Jaffe, 1976). Thus, the lower germination rate (Figure 9c), lower internal K<sup>+</sup> concentrations in pollen grains (Figure 9e-i) and shorter pollen tubes (Figure 9d) in the *slhak5-1* mutant could be due to the absence of SIHAK5-mediated K<sup>+</sup> uptake and, in turn, reduced lower turgor pressure in pollen grains. This is in agreement with the appearance of *slhak5-1* pollen grains and tubes which looked flaccid (Figure 9a). It is worth noting that OsHAK1 has been also related to rice fertility and pollen viability (Chen, Zhang, et al., 2018) and the interaction of this transporter with the receptor-like kinase RUPO may play an important role in this contribution (Liu et al., 2016).

High-affinity HAK K<sup>+</sup> transporters have been suggested to mediate K<sup>+</sup> influx into the cell in co-transport with H<sup>+</sup> (Rodríguez-Navarro, 2000). The question rises why such a mechanism may be required in pollen physiology. Polarized pollen tube growth requires the function of specific transport systems at specific regions of the pollen tube (Michard, Simon, Tavares, Wudick, & Feijó, 2017). It is possible that, at some local points or moments during tube growth, the electrochemical gradient for K<sup>+</sup> makes coupling to H<sup>+</sup> a requirement for K<sup>+</sup> accumulation. In addition, H<sup>+</sup> gradients within the pollen tube have been related to its polarized growth (Weisenseel & Jaffe, 1976), with an acidic tip and an alkaline subapical region, and H<sup>+</sup> may also act in signalling cascades (Michard et al., 2017). Therefore, a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> symport may serve as a mechanism for K<sup>+</sup> accumulation as well as for the movement of H<sup>+</sup> to generate pH gradients.

Importantly, despite the low viability of *slhak5* pollen grains, *slhak5* plants still produce tomato fruits. This is very likely due to the ability of unfertilized tomato flowers to develop fruits (Srivastava & Handa, 2005). The *slhak5-1* fruits were smaller than the WT ones (Figure 7b), probably because the former ones produce less seeds

(Figure 7C) and the number of developing seeds influences the final size and weight of a fruit (Varoquaux, Blanvillain, Delseny, & Gallois, 2000). The described observations regarding the production of almost seedless tomato fruits in *slhak5* plants are of great interest for tomato industry (~100 related patents are in the Google patent database) and they may have a future biotechnological application. In particular, this is important for tomato sauce fabrication, since seeds hinder the process of tomato juice extraction (Varoquaux et al., 2000). Moreover, seedless tomatoes are tastier and have longer shelf-life than seeded tomatoes (Varoquaux et al., 2000). There are several natural parthenocarpic tomato cultivars but have disadvantages due to the pleiotropic effects of the genes involved (Varoquaux et al., 2000). In the case of *slhak5* plants, low seed number in tomatoes has no other remarkable defects on plant appearance unless the external K<sup>+</sup> concentration drops below 300 μM for a long time. Thus, the aforementioned features make SIHAK5 an interesting target for breeding tomatoes with few or no seeds.

## 4 | CONCLUSIONS

Our work provides a molecular mechanism, based on SIHAK5 function, which could help to improve K<sup>+</sup> nutrition and salt tolerance in tomato plants. Plants lacking SIHAK5 may indeed be of interest to produce low-Cs<sup>+</sup> tomatoes in radiocaesium-contaminated environments. However, work is still required to separate the beneficial effect of the *slhak5* mutation at the root, that reduces Cs<sup>+</sup> uptake in the plant, from its detrimental effect at the shoot, which affects pollen viability and reduces fruit yield. Several strategies, from grafting to a root-specific *slhak5* knock-out could be used to circumvent the low-yield phenotype of *slhak5* plants. In contrast, *slhak5* plants can be used to produce tomato fruits with few or no seeds. In addition, the role of SIHAK5 in tomato plants can be regarded as a valuable model for other crops that produce fleshy fruits and to open new avenues for crop biotechnology in the forthcoming years.

## 5 | MATERIALS AND METHODS

### 5.1 | Plant material and growth conditions

Tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. var Micro-Tom) were used throughout the work. Plants were grown as described previously (Nieves-Cordones et al., 2007). Seeds were germinated in a 0.5 mM aerated CaSO<sub>4</sub> solution for 72 hr and then transferred to vermiculite. After 7 days, seedlings were transferred to 8 L containers with aerated nutrient solution that consisted of macronutrients (mM): 1.4 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.2 MgSO<sub>4</sub> and 0.1 Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> and micronutrients (μM): 50 CaCl<sub>2</sub>, 12.5 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 MnSO<sub>4</sub>, 1 ZnSO<sub>4</sub>, 0.5 CuSO<sub>4</sub>, 0.1 H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.1 NiSO<sub>4</sub> and 10 Fe-EDDHA. KCl, NaCl or CsCl were added as indicated in each experiment. Plants were grown in that solution for the indicated time period as indicated in each experiment in a controlled-environment growth chamber with 16/8 hr light/night photoperiod,

at 25°C (day) 20°C (night) temperature, 65% relative humidity and 360  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  flux density. pH of the nutrient solutions was adjusted daily to 5.5. Fresh solution was supplied once a week.

## 5.2 | Production of SIHAK5 KO plants with CRISPR-Cas

To produce KO mutants of SIHAK5, two sgRNA sequences (sgRNA1 and sgRNA2), which targeted exons 1 and 2, respectively, of the *SIHAK5* locus (*Solyc12g005670*) (Figure 1) were designed with the web tool Breaking Cas (Oliveros et al., 2016). Target sequences were selected for their high specificity (cut probability in off-target sites <0.4%, Figure S6). Complementary spacer sequences of the sgRNAs were cloned into plasmid A59 and moved to plasmid A60 (property of Abiopep Plant Health S.A.) and the resulting construct transformed into *A. tumefaciens* strain GV3101. The A59 plasmid is an entry vector to clone a sgRNA spacer sequence in frame with a sgRNA scaffold and downstream of an adequate promoter. This vector contains two sgRNAs expression cassettes of this type. Both sgRNA expression cassettes can be transferred into A60 (plant expression vector). The A60 contains the Cas9 expression cassette, a plant marker gene and sgRNAs expression cassettes, all these features located in a T-DNA region (to allow expression of these components in the plant). The presence of two sgRNAs in A60 allows edition of *SIHAK5* at two different sites. Transgenic tomato lines were produced by incubating cotyledons of WT Micro-Tom with suspensions of transformed *Agrobacterium* and subsequent regeneration of whole plants (T0 generation) by in vitro culture (Van Eck, Keen, & Tjahjadi, 2019). Genomic DNA around the target regions of sgRNA was amplified by PCR (Table S3) and sequenced. Then, allele sequences were first deduced using CRISP-Id tool (Dehairs, Talebi, Cherifi, & Swinnen, 2016) and later confirmed by cloning into TOPO PCR2.1 vector and sequencing. Plant lines with interesting alleles were selected for further characterization. Plant genotypes were also determined in T1 and T2 *shak5* plants (Table S1) and all experiments were carried out with T2 *shak5* plants. Identification of off-target sites was achieved with the Breaking Cas tool (Figure S6). Off-targets in exon sequences were checked by sequencing in T2 plants and they were found not to be mutated (Table S2). This indicated that *shak5* plants contained only mutations in *SIHAK5*.

## 5.3 | Short-term Rb<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> uptake experiments, ion content and TF<sub>fruit</sub> determinations

Plants were grown as described in each experiment. For short-term Rb<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> uptake experiments, plants starved of K<sup>+</sup> for 7 days were transferred to K<sup>+</sup>-free solutions supplemented with 0.02 and 1 mM of RbCl or CsCl for 6 hr. Rb<sup>+</sup> or Cs<sup>+</sup> uptake rates were calculated from their accumulation in the plant per unit of time and unit of root dry weight.

In all experiments, plant organs were harvested, their fresh weight determined and dried in a 65°C oven for 4 days to determine their

dry weight. Plant material was digested with HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub> (2:1, v:v) and K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Rb<sup>+</sup> concentration was determined by ICP spectrometry analysis (Iris Interpid II, Thermo Electron Corporation, Franklin). Tissue Cs<sup>+</sup> concentration was determined by atomic emission spectrometry in an AAnalyst Perking-Elmer 400 spectrometer.

TF<sub>fruit</sub> was calculated as the ratio between fruit Cs<sup>+</sup> concentration (expressed in mM) and the external Cs<sup>+</sup> concentration (expressed in mM).

## 5.4 | Root cell plasma membrane potentials determination

Root cell membrane potential was determined as described previously (Nieves-Cordones et al., 2008). Seeds of tomato plants were germinated and grown for 7 days in 0.5 mM CaSO<sub>4</sub> solution. Two centimetre root tips were excised and mounted on a perfusion chamber. Root epidermal or cortical cells were impaled with a single-barrelled borosilicate microelectrodes filled with 0.2 M KCl and connected to a duo 773 WPI high-impedance amplifier. Roots were perfused (10 ml/min) with a solution containing 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> buffered to pH 6 (10 mM MES/Bis-Tris) and different amounts of KCl to reach the indicated concentrations. Membrane depolarizations induced by the presence of K<sup>+</sup> were plotted against the external K<sup>+</sup> concentrations and the data fitted to Michaelis-Menten equations to determine  $K_m$  and the maximal depolarization values. Experiments were repeated with different plants and the mean values of at least three repetitions per value of external K<sup>+</sup> used are shown.

## 5.5 | Real-time qPCR

Expression levels of *SIHAK5* in WT plants were determined by real-time qPCR as described previously (Rodenas et al., 2018). RNA was isolated with the NucleoSpin, RNA Plant (Macherey-Nagel) kit from the different tissues of plants grown with the complete nutrient solution containing 1.4 mM K<sup>+</sup>. After cDNA synthesis with the High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), qPCR was performed on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Expression levels of *SIHAK5* relative to the expression level of the endogenous gene encoding, the elongation factor SIEF1 $\alpha$  are given as  $40 - \Delta\text{Ct}$  ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{SIHAK5}} - \text{Ct}_{\text{SIEF1}\alpha}$ ). The primers used are given in Table S3.

## 5.6 | Pollen germination, tube elongation and estimation of internal K<sup>+</sup>

Pollen grains from flowers were germinated as described previously (Maisonneuve & Den Nijs, 1984). Pollen was sprinkled on a microscope slide covered with medium composed of 0.5% agar, 10% sucrose and 50 ppm H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. The basal K<sup>+</sup> concentration of this medium was ~100  $\mu\text{M}$ . Slides were incubated on a filter paper soaked



with water inside a petri dish at 25°C for 4 hr. Pollen was observed under a microscope. Germination percentages and pollen tube length were determined by using ImageJ software.

To estimate the internal K<sup>+</sup> concentration of pollen, Ion-K<sup>+</sup> green 4 AM (IPG-4, Iona Biosciences, San Marcos, Texas) dye was added to the germination medium at 20 μM. Slides were observed under an epifluorescence microscope (Leica DM6) after 16 hr. IPG-4 fluorescence was recovered with a 527/30 nm band pass filter after exciting at 480/40 nm. IPG-4 fluorescence was determined by using ImageJ software after subtracting mean fluorescence from pollen grains without dye (pollen autofluorescence).

## 5.7 | Statistical analysis

Analysis of variance was performed with the Statistix V.8 software for Windows (Analytical Software, Tallahassee, Florida). The differences in means were compared either by Student's *t* test (pair comparisons) or by using a Tukey's multiple range test ( $p < .05$ ) after analysis of variance. Sigma Plot 9.0 was used for data fitting.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Grant Number 20806/PI/18 (to F. R.) from Fundación Séneca of Región de Murcia, Spain and by I-COOP grant from the CSIC (COOPA20177) and it was also supported by grant numbers AGL2015-66434-R (to F. R.) and AGL2015-74011-JIN (to M. N.-C.) from Ministerio de Economía y Competitividad, Spain. M. N.-C. is recipient of a Ramón y Cajal Fellowship (RyC-2017-21924) from Ministerio de Economía y Competitividad, Spain. A. L. and J. A. are recipients of a F. P. U. Fellowship from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain. We thank Cristina López and Maria del Carmen García for their skillful technical assistance. This work was also supported by the Red de Excelencia BIO2016-81957-REDT from Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors have filed a patent application based on the results reported in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M. N. C. and A. L. contributed equally to the manuscript. M. N. C. designed the experiments, obtained the edited mutants, performed experiments, analysed and discussed the results and contributed to writing the paper. A. L. performed the experiments and analysis. M. S. and J. A. contributed to sample collection and analysis. P. R.-S. generated the transgenic lines. R. M. R., V. M. and M. A. B. contributed to design the experiments and results discussion. F. R. contributed to design and perform the experiments, discuss the results and writing the manuscript.

## ORCID

Manuel Nieves-Cordones  <https://orcid.org/0000-0002-4015-0981>

Rosa M. Rivero  <https://orcid.org/0000-0003-3880-0241>

Francisco Rubio  <https://orcid.org/0000-0001-7640-9548>

## REFERENCES

- Aleman, F., Caballero, F., Ródenas, R., Rivero, R. M., Martínez, V., & Rubio, F. (2014). The F130S point mutation in the *Arabidopsis* high-affinity K<sup>+</sup> transporter *AthAK5* increases K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> selectivity and confers Na<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> tolerance to yeast under heterologous expression. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Aleman, 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, 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., Hammond, J. P., Armengaud, P., White, P. J., & Callow, J. A. (2006). Nutrient sensing and signalling in plants: Potassium and phosphorus. In *Advances in botanical research* (pp. 209–257). London, England: Academic Press.
- Bacha, H., Rodenas, R., Lopez-Gomez, E., Francisco, G.-L. M., Nieves-Cordones, M., Rivero, R. M., ... Rubio, F. (2015). High Ca<sup>2+</sup> reverts the repression of high-affinity K<sup>+</sup> uptake produced by Na<sup>+</sup> in *Solanum lycopersicum* L. (var. microtom) plants. *Journal of Plant Physiology*, 180, 72–79.
- Burger, A., & Lichtscheidl, I. (2018). Stable and radioactive cesium: A review about distribution in the environment, uptake and translocation in plants, plant reactions and plants' potential for bioremediation. *Science of the Total Environment*, 618, 1459–1485.
- Chen, G., Hu, Q., Luo, L., Yang, T., Zhang, S., Hu, Y., ... Xu, G. (2015). Rice potassium transporter *OsHAK1* is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant Cell and Environment*, 38, 2747–2765.
- Chen, G., Liu, C., Gao, Z., Zhang, Y., Zhang, A., Zhu, L., ... Qian, Q. (2018). Variation in the abundance of *OsHAK1* transcript underlies the differential salinity tolerance of an indica and a japonica Rice cultivar. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Chen, G., Zhang, Y., Ruan, B., Guo, L., Zeng, D., Gao, Z., ... Qian, Q. (2018). *OsHAK1* controls the vegetative growth and panicle fertility of rice by its effect on potassium-mediated sugar metabolism. *Plant Science*, 274, 261–270.
- Collander, R. (1941). Selective absorption of cations by higher plants. *Plant Physiology*, 16, 691–720.
- Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heysler, R., ... Hedrich, R. (2002). Loss of the *AKT2/3* potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta*, 216, 334–344.
- Dehairs, J., Talebi, A., Cherifi, Y., & Swinnen, J. V. (2016). CRISP-ID: Decoding CRISPR mediated indels by Sanger sequencing. *Scientific Reports*, 6, 28973.
- Fan, L. M., Wang, Y. F., Wang, H., & Wu, W. H. (2001). In vitro *Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1603–1614.
- Franceschinelli, E. V., Silva Neto, C. M., Lima, F. G., Gonçalves, B. B., Bergamini, L. L., Bergamini, B. A. R., & Elias, M. A. (2013). Native bees pollinate tomato flowers and increase fruit production. *Journal of Pollination Ecology*, 11, 41–45.
- Fujimura, S., Yoshioka, K., Ota, T., Ishikawa, T., Sato, M., & Satou, M. (2016). The inhibitory effects of potassium chloride versus potassium silicate application on (137)Cs uptake by rice. *Journal of Environmental Radioactivity*, 153, 188–194.
- Fujiwara, T. (2013). Cesium uptake in rice: Possible transporter, distribution, and variation. In T. M. Nakanishi & K. Tanoi (Eds.), *Agricultural implications of the Fukushima nuclear accident*. Tokyo, Japan: Springer.
- Genies, L., Orjollet, D., Carasco, L., Camilleri, V., Frelon, S., Vavasour, A., ... Henner, P. (2017). Uptake and translocation of cesium by *Arabidopsis thaliana* in hydroponics conditions: Links between kinetics and

- molecular mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, *138*, 164–172.
- Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J., & Verbruggen, N. (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*, *11*, 610–617.
- Horie, T., Costa, A., Kim, T. H., Han, M. J., Horie, R., Leung, H. Y., ... Schroeder, J. I. (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. *EMBO Journal*, *26*, 3003–3014.
- Lepage, H., Evrard, O., Onda, Y., Lefevre, I., Lacey, J. P., & Ayrault, S. (2015). Depth distribution of cesium-137 in paddy fields across the Fukushima pollution plume in 2013. *Journal of Environmental Radioactivity*, *147*, 157–164.
- Liu, L., Zheng, C., Kuang, B., Wei, L., Yan, L., & Wang, T. (2016). Receptor-like kinase RUP1 interacts with potassium transporters to regulate pollen tube growth and integrity in rice. *PLoS Genetics*, *12*, e1006085.
- Luan, M., Tang, R.-J., Tang, Y., Tian, W., Hou, C., Zhao, F., ... Luan, S. (2017). Transport and homeostasis of potassium and phosphate: Limiting factors for sustainable crop production. *Journal of Experimental Botany*, *68*, 3091–3105.
- Maathuis, F. J. M. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*, 250–258.
- Maathuis, F. J. M., & Sanders, D. (1993). Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Plant*, *191*, 302–307.
- Mähs, A., Steinhorst, L., Han, J.-P., Shen, L.-K., Wang, Y., & Kudla, J. (2013). The Calcineurin B-like Ca<sup>2+</sup> sensors CBL1 and CBL9 function in pollen germination and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, *6*, 1149–1162.
- Maisonneuve, B., & Den Nijs, A. P. M. (1984). In vitro pollen germination and tube growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and its relation with plant growth. *Euphytica*, *33*, 833–840.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. New York, NY: Springer.
- Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H., & Appel, T. (2001). *Principles of plant nutrition*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- Michard, E., Simon, A. A., Tavares, B., Wudick, M. M., & Feijó, J. A. (2017). Signaling with ions: The keystone for apical cell growth and morphogenesis in pollen tubes. *Plant Physiology*, *173*, 91–111.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytologist*, *167*, 645–663.
- Nagao, S., Kanamori, M., Ochiai, S., Tomihara, S., Fukushi, K., & Yamamoto, M. (2013). Export of <sup>134</sup>Cs and <sup>137</sup>Cs in the Fukushima river systems at heavy rains by Typhoon Roke in September 2011. *Biogeochemistry*, *10*, 6215–6223.
- Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Martinez, V., & Rubio, F. (2010). The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K<sup>+</sup> transporter is required for plant growth and K<sup>+</sup> acquisition from low K<sup>+</sup> solutions under saline conditions. *Molecular Plant*, *3*, 326–333.
- Nieves-Cordones, M., Martinez-Cordero, M. A., Martinez, 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*, 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*, 521–532.
- Nieves-Cordones, M., Mohamed, S., Tanoi, K., Kobayashi, N. I., Takagi, K., Vernet, A., ... Very, A. A. (2017). Production of low-Cs(+) rice plants by inactivation of the K(+) transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. *Plant Journal*, *92*, 43–56.
- Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., & Pardo, J. M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*, *109*, 735–742.
- Ohmori, Y., Kajikawa, M., Nishida, S., Tanaka, N., Kobayashi, N. I., Tanoi, K., ... Fujiwara, T. (2014). The effect of fertilization on cesium concentration of rice grown in a paddy field in Fukushima Prefecture in 2011 and 2012. *Journal of Plant Research*, *127*, 67–71.
- Oliveros, J. C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San-León, D., Montoliu, L., Cubas, P., & Pazos, F. (2016). Breaking-Cas—Interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Research*, *44*, W267–W271.
- Pyo, Y. J., Gierth, M., Schroeder, J. I., & Cho, M. H. (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 Physiology*, *153*, 863–875.
- Qi, Z., Hampton, C. R., Shin, R., Barkla, B. J., White, P. J., & Schachtman, D. P. (2008). The high affinity K<sup>+</sup> transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K<sup>+</sup> concentrations and provides a caesium uptake pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *59*, 595–607.
- Rai, H., Yokoyama, S., Satoh-Nagasawa, N., Furukawa, J., Nomi, T., Ito, Y., ... Hattori, H. (2017). Cesium uptake by rice roots largely depends upon a single gene, HAK1, which encodes a potassium transporter. *Plant and Cell Physiology*, *58*, 1486–1493.
- Rodenas, R., Nieves-Cordones, M., Rivero, R. M., Martinez, V., & Rubio, F. (2018). Pharmacological and gene regulation properties point to the SHAK5 K(+) transporter as a system for high-affinity Cs(+) uptake in tomato plants. *Physiologia Plantarum*, *162*, 455–466.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1469*, 1–30.
- Römheld, V., & Kirkby, E. (2010). Research on potassium in agriculture: Needs and prospects. *Plant and Soil*, *335*, 155–180.
- Rubio, F., Alemán, F., Nieves-Cordones, M., & Martínez, V. (2010). Studies on *Arabidopsis* atak5, atakt1 double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K<sup>+</sup> uptake. *Physiologia Plantarum*, *139*, 220–228.
- 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. *Physiologia Plantarum*, *134*, 598–608.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Horie, T., & Shabala, S. (2020). Doing ‘business as usual’ comes with a cost: Evaluating energy cost of maintaining plant intracellular K(+) homeostasis under saline conditions. *New Phytologist*, *225*, 1097–1104.
- Sakai, M., Gomi, T., Nunokawa, M., Wakahara, T., & Onda, Y. (2014). Soil removal as a decontamination practice and radiocesium accumulation in tadpoles in rice paddies at Fukushima. *Environmental Pollution*, *187*, 112–115.
- Shabala, S., & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: Implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, *151*, 257–279.
- Shen, Y., Shen, L., Shen, Z., Jing, W., Ge, H., Zhao, J., & Zhang, W. (2015). The potassium transporter OsHAK21 functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice. *Plant Cell and Environment*, *38*, 2766–2779.
- Spalding, E. P., Hirsch, R. E., Lewis, D. R., Qi, Z., Sussman, M. R., & Lewis, B. D. (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *Journal of General Physiology*, *113*, 909–918.
- Srivastava, A., & Handa, A. K. (2005). Hormonal regulation of tomato fruit development: A molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation*, *24*, 67–82.
- Stewart, W. M., Dibb, D. W., Johnston, A. E., & Smyth, T. J. (2005). The contribution of commercial fertilizer nutrients to food production. *Agronomy Journal*, *97*, 1–6.
- Van Eck, J., Keen, P., & Tjahjadi, M. (2019). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tomato. *Methods in Molecular Biology*, *1864*, 225–234.
- Varoquaux, F., Blanvillain, R., Delseny, M., & Gallois, P. (2000). Less is better: New approaches for seedless fruit production. *Trends in Biotechnology*, *18*, 233–242.
- Wakabayashi, S., Itoh, S., Kihou, N., Matsunami, H., Hachinohe, M., Hamamatsu, S., & Takahashi, S. (2016). Influence of water

management and fertilizer application on (137)Cs and (133)Cs uptake in paddy rice fields. *Journal of Environmental Radioactivity*, 157, 102–112.

Wakeel, A., Farooq, M., Qadir, M., & Schubert, S. (2011). Potassium substitution by sodium in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30, 401–413.

Weisenseel, M. H., & Jaffe, L. F. (1976). The major growth current through lily pollen tubes enters as K<sup>(+)</sup> and leaves as H<sup>(+)</sup>. *Planta*, 133, 1–7.

White, P. J., & Broadley, M. R. (2000). Mechanisms of caesium uptake by plants. *New Phytologist*, 147, 241–256.

White, P. J., & Karley, A. J. (2010). Potassium. In R. M. R. R. Hell (Ed.), *Cell biology of metals and nutrients* (pp. 199–224). Heidelberg, Germany: Springer.

Wilhelmi, L. K., & Preuss, D. (1999). The mating game: Pollination and fertilization in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 18–22.

Wu, H., Zhang, X., Giraldo, J. P., & Shabala, S. (2018). It is not all about sodium: Revealing tissue specificity and signalling roles of potassium in plant responses to salt stress. *Plant and Soil*, 431, 1–17.

Yasunari, T. J., Stohl, A., Hayano, R. S., Burkhart, J. F., Eckhardt, S., & Yasunari, T. (2011). Cesium-137 deposition and contamination of Japanese soils due to the Fukushima nuclear accident. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 19530–19534.

Yasutaka, T., Miyoshi, H., & Ito, K. (2014). Transfer of radiocesium from hydroponic medium to potherb mustard and tomato plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 60, 818–823.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.