UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA, ALIMENTARIA
Y DE BIOSISTEMAS**

**Análisis funcional y genético de la entrada de Na^+
en la raíz y de la tolerancia a la salinidad en
Arabidopsis thaliana.**

TESIS DOCTORAL

ROCÍO ÁLVAREZ ARAGÓN

Lda. en Bioquímica

MADRID, 2018

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA, ALIMENTARIA
Y DE BIOSISTEMAS**

**Análisis funcional y genético de la entrada de Na⁺
en la raíz y de la tolerancia a la salinidad en
Arabidopsis thaliana.**

TESIS DOCTORAL

ROCÍO ÁLVAREZ ARAGÓN

Lda. en Bioquímica

Directora: BEGOÑA BENITO CASADO

Profesora Titular de Universidad

E.T.S.I.A.A.B.

Universidad Politécnica de Madrid

MADRID, 2018

Análisis funcional y genético de la entrada de Na⁺ en la raíz y de la tolerancia a la salinidad en *Arabidopsis thaliana*.

Esta memoria se presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Madrid,

La doctoranda,

Rocío Álvarez Aragónl

Vº Bº Director de Tesis,

Begoña Benito Casado

Profesora Titular de Universidad

E.T.S.I.A.A.B.

Madrid, noviembre 2018

A mi familia

ÍNDICE

Resumen.....	xiii-xiv
Abstract.....	xv-xvii
Abreviaturas.....	xvii
 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	 1
 1.1 El problema de la salinidad.....	 1
1.2 Principales transportadores implicados en la distribución del Na⁺ en la planta.....	3
1.2.1 <u>Entrada de Na⁺ en la raíz.....</u>	3
1.2.2. <u>Salida de Na⁺ y recuperación del Na⁺ xilemático.....</u>	6
1.2.3 <u>Compartimentación intracelular del Na⁺.....</u>	7
1.3 Discrepancias con el modelo de toxicidad del Na⁺.....	8
1.4 Arabidopsis como modelo.....	11
1.5 Objetivos del presente trabajo.....	12
 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	 13
 2.1 Antibióticos, enzimas y reactivos.....	 13
2.2 Material biológico:.....	13
2.2.1 <u>Bacterias y condiciones de crecimiento.....</u>	13
2.2.2 <u>Levaduras y condiciones de crecimiento.....</u>	14
2.2.3 <u>Material vegetal y condiciones de crecimiento.....</u>	15
2.2.3.1 <i>Esterilización y estratificación de semillas de Arabidopsis y Eutrema.....</i>	16
2.2.3.2 <i>Crecimiento en medio hidropónico.....</i>	16
2.3 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.....	17
2.3.1 <u>Aislamiento y manipulación de DNA plasmídico.....</u>	17
2.3.2 <u>Transformación de bacterias y levaduras.....</u>	18

2.3.3 <u>Subclonaje de cDNA EsSOS1 y AtSOS1 en vectores de expresión de bacteria y levadura</u>	19
2.3.4 <u>Análisis de genotipado de los mutantes de Arabidopsis</u>	19
2.3.5 <u>Aislamiento y purificación de RNA de tejido vegetal</u>	20
2.4 Estudios fisiológicos en bacterias y levaduras	21
2.4.1 <u>Ensayos de complementación en bacteria y levadura</u>	21
2.4.1.1 <i>Ensayos de complementación en bacteria y levadura mediante el test de la gota</i>	21
2.4.1.2 <i>Ensayos de complementación en levadura mediante curvas de crecimiento</i>	21
2.4.2 <u>Ensayos de flujos de cationes</u>	22
2.5 Estudios fisiológicos en plantas	23
2.5.1 <u>Experimentos de distribución y acumulación de Na⁺</u>	23
2.5.2 <u>Experimentos de entrada de Na⁺</u>	25
2.5.3 <u>Experimentos de ajuste osmótico</u>	26
2.5.3.1 <i>Determinación del ajuste osmótico en presencia de sorbitol</i>	26
2.5.3.2 <i>Ajuste osmótico en alta salinidad</i>	27
2.5.4 <u>Análisis de contenido en antocianinas y clorofila</u>	28
2.6. Análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva por RNA-seq	29
2.6.1 <u>Análisis de términos de ontología de genes</u>	30
2.6.2 <u>Agrupamientos jerárquicos de expresión diferencial</u>	30
2.7 Análisis estadísticos	30
2.8 Herramientas bioinformáticas	31
2.9 Verificación molecular y fisiológica del silenciamiento en las líneas de EsSOS1	31
 3.	
RESULTADOS	34
 3.1 Crecimiento y acumulación de Na ⁺ en plantas de Arabidopsis en medio hidropónico.....	34
3.1.1 <u>Puesta a punto del sistema experimental</u>	34
3.1.2 <u>Contenido basal de Na⁺ en el medio</u>	36

3.1.3 <u>Expresión del contenido en Na⁺</u>	37
3.2 Análisis funcional y genético de la acumulación de Na⁺ en Arabidopsis	39
3.2.1 <u>Caracterización fisiológica de la acumulación de Na⁺ durante el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i></u>	39
3.2.1.1 <i>Crecimiento de plantas de Arabidopsis Col-0 y Ts-1</i>	39
3.2.1.2 <i>Contenido en Na⁺ de plantas de Arabidopsis Col-0 y Ts-1</i>	42
3.2.1.3 <i>Toxicidad del Na⁺ en Arabidopsis a bajo NaCl</i>	47
3.2.1.3.1 <i>Toxicidad del Na⁺ en la parte aérea de plantas hkt1-4</i>	49
3.2.1.3.2 <i>Toxicidad del Na⁺ en la raíz de plantas sos1-1</i>	53
3.2.1.3.3 <i>Síntomas asociados a la toxicidad del Na⁺ en parte aérea y en raíz</i>	54
3.2.1.4 <i>Origen de la inhibición del crecimiento por NaCl en Arabidopsis thaliana</i>	57
3.2.1.4.1 <i>Inhibición del crecimiento sin toxicidad</i>	57
3.2.1.4.2 <i>Caracterización del efecto osmótico</i>	62
3.2.1.5 <i>Papel del Na⁺ en la respuesta osmótica de las plantas al estrés salino</i>	64
3.2.1.5.1 <i>Ajuste osmótico en condiciones de salinidad moderada</i>	64
3.2.1.5.2 <i>Ajuste osmótico en condiciones de alta salinidad</i>	66
3.2.2 <u>Variación natural de la tolerancia a la salinidad en <i>Arabidopsis thaliana</i></u>	71
3.2.2.1 <i>Tolerancia a la salinidad de accesiones de Arabidopsis thaliana</i>	71
3.2.2.2 <i>Relación de la función HKT1 y la toxicidad del Na⁺</i>	74
3.3 Análisis funcional y genético de la entrada de Na⁺ en Arabidopsis	76
3.3.1 <u>Caracterización fisiológica de la entrada de Na⁺ en Arabidopsis</u>	76
3.3.1.1 <i>Dependencia de nitrato en la acumulación de Na⁺ en la parte aérea de plantas hkt1</i>	76
3.3.1.2 <i>Efecto del nitrato en la toma de Na⁺ por la raíz y la carga de Na⁺ al xilema</i>	83
3.3.1.3 <i>Interrelación entre SOS1 y nitrato en la carga de Na⁺ al xilema</i>	84
3.3.1.4 <i>Variabilidad natural en la entrada de Na⁺</i>	86
3.3.1.5 <i>Papel de NRT1.1 en el transporte de Na⁺ dependiente de nitrato</i>	88
3.3.1.6 <i>Identificación de posibles transportadores de Na⁺ y nitrato en Arabidopsis</i>	89
3.3.2 <u>Búsqueda de sistemas de entrada de Na⁺ en la planta a través del análisis de la expresión génica</u>	91
3.3.2.1 <i>Análisis transcriptómico durante la entrada de Na⁺</i>	91
3.3.2.1.1 <i>Expresión génica de transportadores de nitrato durante la entrada de Na⁺</i>	97
3.3.2.1.2 <i>Expresión génica de otros sistemas de transporte durante la entrada de Na⁺</i> ...	98

3.3.2.2 <i>Entrada de Na⁺ en mutantes de transportadores de nitrato</i>	101
3.3.2.3 <i>Entrada de Na⁺ en mutantes de otros transportadores</i>	101
3.4 Comparación funcional de la acumulación de Na⁺ en la glicofita <i>Arabidopsis thaliana</i> y en la halofita <i>Eutrema salsugineum</i>	106
3.4.1 <u>Acumulación de Na⁺ en <i>Eutrema salsugineum</i></u>	106
3.4.2 <u>Función del transportador SOS1 de <i>Eutrema salsugineum</i></u>	113
3.4.2.1 <i>Caracterización funcional del gen EsSOS1 en bacteria</i>	113
3.4.2.2 <i>Caracterización funcional del gen EsSOS1 en levadura</i>	114
3.4.3 <u>Entrada de Na⁺ en <i>Eutrema</i></u>	121
4. DISCUSIÓN	122
4.1 Sistema Experimental.....	122
4.2 Análisis funcional y genético de la acumulación de Na ⁺ en <i>Arabidopsis</i>	123
4.2.1 <u>Efecto tóxico del Na⁺</u>	123
4.2.2 Efecto osmótico del Na ⁺	127
4.2.3 Un efecto inhibidor de origen desconocido.....	129
4.3 Análisis funcional y genético de la entrada de Na ⁺ en <i>Arabidopsis</i>	130
4.3.1 <u>Caracterización fisiológica de la entrada de Na⁺ en <i>Arabidopsis</i></u>	130
4.3.2 <u>Análisis transcriptómico durante la entrada de Na⁺</u>	134
4.3.2.1 <i>Selección de genes para el estudio fenotípico de sus mutantes</i>	137
4.4 Acumulación de Na ⁺ en <i>Eutrema</i>	142
4.5 Perspectivas de futuro.....	145
5. CONCLUSIONES	147
6. BIBLIOGRAFÍA	149

Resumen

En las próximas décadas habrá que duplicar la producción actual de alimentos para poder abastecer a la población. Sin embargo, una agricultura productiva no es compatible con la salinización de los terrenos ya que la mayor parte de las plantas cultivadas son sensibles al NaCl, incluso a concentraciones moderadas. Este problema se agrava con la mala calidad de las aguas de regadío, cada vez más salinas, que intensifican la salinización de los suelos y con el cambio climático que promueve la desertización de los terrenos originando la concentración de las sales. A pesar de enormes esfuerzos realizados, Poco se conoce sobre las causas de esta incompatibilidad, incluyendo el mecanismo de entrada de Na^+ en la planta.

La intolerancia al NaCl de las plantas glicofitas se puede deber a dos causas, un efecto osmótico que lleva asociado un déficit hídrico debido a la disminución del potencial osmótico del suelo y un efecto tóxico que se asocia a daños por la acumulación del ión Na^+ en las hojas. En este trabajo hemos estudiado los efectos del NaCl sobre la planta glicofita *Arabidopsis thaliana* en concentraciones de Na^+ moderadas en las que la planta sobrevive, aunque se inhibe su crecimiento.

Usando mutantes en dos de los transportadores de Na^+ más importantes (SOS1 y HKT1) y numerosas accesiones y líneas RILs, hemos encontrado que los efectos de toxicidad de Na^+ pueden originarse tanto en raíz como en parte aérea y que, aunque hay accesiones que se intoxican e inhiben por Na^+ , esta no es la causa principal de la inhibición del crecimiento de *Arabidopsis*. Tampoco el estrés osmótico parece el causante principal de la inhibición en la planta, ya que en nuestras condiciones de salinidad no observamos un déficit hídrico en ninguna de las accesiones ensayadas. Sin embargo, sí varió el contenido en agua de las plantas expuestas a otros osmóticos no iónicos como azúcares. Creciendo en salinidad, la planta ajustó su potencial osmótico elevando el contenido de Na^+ más K^+ . Este ajuste osmótico se observó también en plantas expuestas durante 24 h a condiciones de alta salinidad con un potencial osmótico de -1.0 MPa (400 mOsm). Dichas plantas moderaron la pérdida de agua elevando el contenido de sales Na^+ y K^+ y presentando un marchitamiento transitorio, al contrario que las plantas expuestas al mismo potencial

osmótico, pero en forma de compuesto no iónico que no permite la acumulación de Na^+ y que presentaron un marchitamiento permanente asociado a un notable déficit hídrico.

Nuestros resultados sobre la entrada y acumulación de Na^+ muestran que existe una dependencia del nitrato en la toma de Na^+ por la raíz, y su translocación al xilema. Esta estimulación por nitrato varía entre las accesiones y entre especies relacionadas donde otros aniones como el sulfato, podrían suplir esa función. En esta vía de acumulación de Na^+ proponemos la existencia de dos sistemas de transporte que trabajan en serie mediando la toma de Na^+ del exterior y el paso a los vasos del xilema. Nuestros resultados muestran que en esta vía nitrato-dependiente de entrada de Na^+ está implicado el transportador/regulador NRT1.1, bien mediando directamente el transporte de Na^+ o bien regulando a otro sistema

En nuestro intento por identificar al transportador principal responsable de la entrada de Na^+ , realizamos un análisis transcriptómico por RNA seq de la respuesta de *Arabidopsis* durante dicha entrada, ya que existía la posibilidad de que el transportador implicado estuviese regulado de manera transcripcional. A pesar de que aún no hemos podido identificar al transportador que media dicha entrada, este análisis nos ha permitido identificar un canal de K^+ , SKOR, que parece estar implicado en la absorción y distribución de Na^+ en nuestras condiciones.

Finalmente, un análisis comparativo con una especie halotolerante perteneciente a la misma familia que *Arabidopsis*, *Eutrema salsugineum* nos sugiere una novedosa función para el transportador SOS1 de *Eutrema* como transportador de K^+ . Este transportador, expresado de forma heteróloga en bacteria y levadura presenta una dependencia funcional del pH diferente a su homólogo SOS1 de *Arabidopsis*.

Nosotros pensamos que la toma de Na^+ en la raíz y su acumulación en los tejidos cumplen la función primaria de un ajuste osmótico incluso si este proceso produce toxicidad a largo plazo. Aunque la acumulación de Na^+ puede ser tóxica, existe una inhibición en el crecimiento de carácter general que tiene un origen desconocido y que podría ser una respuesta al estrés cuya naturaleza debe ser resuelta. Estas nociones implican la revisión del modelo actual de tolerancia a la salinidad para poder hacer frente al importante reto de conseguir cultivos más tolerantes al Na^+ .

Abstract

According to current estimates, crop yield needs to be duplicated within the next three decades to meet global population needs. However, such high-yield-agricultural production is not compatible with the current levels of soil salinity since most crops are sensitive to sodium chloride (NaCl) even in moderate concentrations. This predicament is aggravated by the poor quality of the water used for irrigation which increases soil salinization and the desertification processes promoted by climate change that increases salt concentration in soil.

Despite intense research in plant salt tolerance, the picture detailing the causes of crop sensitivity to salt as well as the pathways of sodium (Na^+) entrance into the plant is far from being clear. Two major deleterious effects have been attributed to Na^+ in plants that are sensitive to NaCl (glycophytes): an osmotic effect whereby Na^+ decreases soil water potential, which hinders plant water uptake, and a toxic effect whereby Na^+ that has reached plant leaves interfere with plant metabolism. In this work, we have studied the effects of moderate concentrations of NaCl on plant growth in the glycophytic model *Arabidopsis thaliana*. We selected conditions in which although plant growth is reduced, plant survival is not compromised, using mutants affected in key Na^+ transporters (SOS1 and HKT1) and multiple Arabidopsis accessions and recombinant inbred lines. The results show that Na^+ toxic effects can originate either on root or in aerial tissues but these effects are not the main reason causing growth inhibition in Arabidopsis. Furthermore, data shows that the osmotic effects are not the main agent causing growth inhibition either. Therefore, we propose that the growth inhibition associated to moderate concentrations of NaCl is caused by factors that remain elusive to this date.

We have also uncovered a role for Na^+ as cheap osmoticum. In contrast with plants exposed to non-ionic osmotica like sugars, plants exposed to NaCl did not lose any water content, adjusting their osmotic potential by increasing Na^+ and K^+ levels. Even at high NaCl concentrations with very negative osmotic potential (-1.0 MPa corresponding to 400 mOsm) plants were able to mitigate water loss by increasing Na^+ and K^+ levels manifesting only a

transitory wilting. In contrast, plants exposed to the same level of negative osmotic potential brought about by non-ionic osmotica wilted permanently.

We have also addressed Na^+ entrance and accumulation in the plant. Our results show that the presence of nitrate increases both root Na^+ uptake and xylem Na^+ translocation. The relevance of this effect varies across *Arabidopsis* accessions and related Brassiaceae species where other anions like sulfate may perform similar functions. Thus, we have uncovered a nitrate-dependent pathway for Na^+ entry and accumulation in the plant. We propose that this pathway may involve two transport systems working in series mediating Na^+ uptake and its translocation to xylem vessels. We have also showed that the nitrate transporter/regulator NRT1.1 is involved in this pathway, either by directly mediating Na^+ transport or by regulating the activity of an unknown transporter.

As part of our effort to identify the main determinants of Na^+ entrance into the plant, we have analyzed the global transcriptomic response of *Arabidopsis* during Na^+ entry. This analysis allowed the identification of the K^+ channel SKOR as a relevant player of Na^+ uptake and distribution across the plant. Finally, we compared Na^+ entry and accumulation in *Arabidopsis* and a related species with a halophyte lifestyle, *Eutrema salsugineum*. Results suggest that one of the key Na^+ transporters in this halophyte, SOS1, may have differential transport capacities, being able to transport K^+ in this species. Interestingly, heterologous expression experiments indicate a different pH-dependency of SOS1 activity in *Arabidopsis* and *Eutrema*.

All in all, the results in this work indicate that Na^+ entrance and accumulation in the plant fulfills a physiological role where Na^+ is used to adjust plant osmotic potential even though this function might cause toxic effects in the long run. This notion needs to be incorporated to the actual model of plant salt tolerance in order to be successful in the development of crops with increased salt tolerance.

Abreviaturas y Símbolos

A	Adenina
ABA	Ácido abscísico
ANOVA	Análisis de varianza (ANalysis Of VAriance)
ATPasa	Familia de proteínas que median un transporte con gasto de ATP
BGI	Beijing Genomic Institute
cDNA	DNA complementario (retrotranscrito a partir de RNA)
CNB	Centro Nacional de Biotecnología
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNaseI	Desoxirribonucleasa I
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
E _m	Potencial de membrana
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDR	False Discovery Rate
FPKM	Fragments Per Kilobase per Million reads
GEDs	Genes Expresados Diferencialmente
h	Horas
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IFs	Inositoles fosfatos
K _m	Constante de Michaelis-Menten
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MM	Medio mínimo de crecimiento de bacterias
mRNA	RNA mensajero
PA	Medio mínimo de crecimiento de levaduras Fosfato de Arginina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PF	Peso fresco
pH	Inverso del logaritmo de la concentración de H ⁺
PS	Peso seco
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciación masiva de RNA (RNA-sequencing)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Ácido salicílico
SD	Medio sintético para el crecimiento de levaduras sin aminoácidos
TBE	Tampón formado por Tris, borato y EDTA
USDA	Departamento de agricultura de Estados Unidos
V _{max}	Velocidad máxima de una reacción química
YPD	Medio para el crecimiento de levaduras que contiene peptona y dextrosa

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El problema de la salinidad

La escasez de agua dulce es un problema que afecta la seguridad alimentaria de la población mundial. “Una persona necesita entre 2 y 4 litros de agua potable al día. Sin embargo, hacen falta cerca de 3 000 litros de agua para producir los alimentos que una persona consume al día” (FAO, 2014). La base de la escasez de agua radica en que no se puede regar con agua marina porque los cultivos son sensibles a la sal. La agricultura de regadío utiliza el 70 % de los recursos de agua dulce, sin embargo no se puede prescindir del regadío porque su productividad duplica la de los cultivos que dependen de la lluvia y produce un tercio de los alimentos que se consumen en el mundo (Munns and Tester, 2008). Como el regadío, además de agua añade sales al suelo, el resultado es un constante aumento de los niveles de sal del terreno si el agua de riego es algo salina.

El departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA) califica un suelo salino como aquel que presenta una conductividad eléctrica de 4 dS m^{-1} , equivalente a 40 mM de NaCl, y esto supone una disminución del rendimiento de la cosecha para la mayoría de cultivos (Munns, 2005). Aunque algunos terrenos puedan presentar localmente niveles altos de diferentes sales, en el contexto agrícola el NaCl es la mayor causa de salinización del suelo (Hasegawa, 2013) y una de los factores ambientales más críticos que limitan la producción agrícola. Por esa razón, conseguir cultivos más tolerantes al NaCl que incrementen la producción en terrenos salinizados y mejoren la eficiencia de los recursos hídricos, es uno de los retos más inmediatos a superar antes de la mitad del siglo, pues se espera que, para entonces, la producción de alimentos no cubra las necesidades de toda la población del planeta. Sin duda, la acumulación de Na^+ en el suelo produce cambios edáficos, pero esto no disminuye la ventaja que se obtendría con los cultivos tolerantes al NaCl.

El NaCl inhibe el crecimiento de las plantas por dos efectos, osmótico y tóxico, que en principio son independientes (Munns and Tester, 2008). El efecto osmótico consiste en una disminución en el potencial hídrico del suelo que reduce la entrada de agua en la planta y desencadena un déficit hídrico que afecta a toda la fisiología de la planta. El efecto tóxico del NaCl se debe a la excesiva acumulación de iones Na^+ y Cl^- . Se ha

descrito que el Cl^- , aunque es un nutriente esencial para la planta, en condiciones de alta salinidad puede llegar a acumularse en las hojas a niveles tóxicos (Li et al., 2017; Teakle and Tyerman 2010). No obstante, a nivel agronómico, únicamente se le asocia con efectos tóxicos sobre algunas especies leñosas como cítricos y viña (Tester and Davenport, 2003). Por ello, en la actualidad, la mayor parte de los efectos perniciosos del NaCl sobre las plantas se atribuyen al Na^+ y en especial a la acumulación del Na^+ en el citoplasma de las células de las hojas, (Hasegawa et al., 2000; Munns and Tester, 2008). En las hojas, la sustitución de K^+ por Na^+ causaría la inhibición de un gran número de procesos bioquímicos, entre ellos, la síntesis de proteínas y la fotosíntesis (Blumwald, 2000; Hauser and Horie, 2010; Horie et al., 2008; Maathuis and Amtmann, 1999).

Está razonablemente establecido que el efecto osmótico del NaCl y el tóxico del Na^+ afectan al crecimiento de las plantas en dos fases temporales de respuesta, una respuesta rápida de inhibición en el crecimiento debida a la disminución del potencial osmótico del suelo, y una respuesta tóxica que es más lenta porque la acumulación de iones es lenta (Munns, 2005; Munns and Tester, 2008b).

No todas las plantas son igualmente sensibles a la presencia de NaCl en el medio en el que crecen. Algunas plantas conocidas como halófilas son capaces de tolerar un bajo potencial hídrico y altas concentraciones de Na^+ , incluso requerir concentraciones notables de NaCl para un crecimiento óptimo. En algunas halofitas, como *Atriplex vesicaria*, desde hace décadas se propone que el Na^+ es un nutriente (Brownell, 1964) y efectos beneficiosos del Na^+ también se han observado en plantas no halofitas con metabolismo C_4 (Brownell and Crossland, 1972) y en otras que son C_3 (Bernstein, 1961; Subbarao et al., 2003; Cuin et al., 2009; Genc et al., 2016;). Sin embargo, la mayoría de las plantas cultivadas pertenecen a un grupo de plantas que son Na^+ intolerantes y que se conocen como glicofitas (Flowers et al., 2010; Rozema and Schat, 2013). Esta intolerancia ocurre a concentraciones relativamente bajas de Na^+ en el medio externo, sobre 40 mM NaCl para la mayoría de las plantas y menos aún en el caso de plantas sensibles como *Arabidopsis thaliana* ú *Oriza sativa* (Munns and Tester, 2008).

Como ya se ha mencionado, una alta sensibilidad al NaCl por razones tóxicas se relaciona con una alta acumulación del catión Na^+ en el citoplasma de las células de las plantas. Es notable que esta alta acumulación es característica de las plantas y no es frecuente en

otros seres vivos expuestos a concentraciones externas de NaCl realmente elevadas. Por ejemplo, a 145 mM Na⁺ en el medio externo, la concentración de Na⁺ intracelular en células de mamífero es 5-15 mM (Alberts et al., 2007) mientras que esa misma concentración intracelular la alcanzan células de la raíz de dos especies brasicáceas, la halosensible *Arabidopsis thaliana* y la halotolerante *Eutrema salsugineum*, con aproximadamente 5 mM Na⁺ externo (Alemán et al., 2009).

Además de las estrategias de tolerancia al NaCl basadas en los principales sistemas de transporte de Na⁺, que se describen a continuación, las plantas tolerantes han desarrollado numerosos mecanismos de adaptación, como son cambios morfológicos que reducen la entrada apoplástica de sal en la planta, con una banda de Caspari dos o tres veces más ancha que en las no halofitas y una segunda endodermis en la raíz (Tester and Davenport, 2003), o modificaciones epidérmicas en forma de glándulas de sal que acumularían Na⁺ en el exterior (Shabala, 2013). En definitiva, cambios que dan cuenta de la extensa variabilidad en la adaptación a la salinidad.

1.2 Principales transportadores implicados en la distribución del Na⁺ en la planta.

En esta noción general del Na⁺ como ión tóxico que debe excluirse de la parte aérea de las plantas se ha basado un modelo simplificado de tolerancia al Na⁺, que se caracteriza por una serie de estrategias encaminadas a mantener en el citoplasma de las células una alta ratio K⁺/Na⁺. Esto requiere de una regulación de la homeostasis iónica que se consigue minimizando la entrada de Na⁺ a la raíz y maximizando la salida de Na⁺ al exterior o la acumulación en las vacuolas de las células radiculares. (Zhu, 2003), a la vez que se restringe el movimiento de iones Na⁺ hacia la parte aérea (Hasegawa and Bressan, 2000; Moller et al., 2009). En estos procesos participan una serie de transportadores específicos, algunos conocidos con bastante precisión y otros que tienen que existir pero que se desconocen.

1.2.1 Entrada de Na⁺ en la raíz

Para producir toxicidad, en las plantas terrestres, el Na⁺ tiene que tener acceso a la planta a través de las raíces. Al estudio de este proceso se ha dedicado mucho esfuerzo pero su conocimiento es aún impreciso (Kronzucker and Britto, 2011).

En primer lugar, en condiciones de salinidad se ha propuesto la entrada de Na^+ a través de una vía apoplástica (García et al., 1997) la cual parece variar entre las especies. Para el arroz, parece ser relevante fisiológicamente en condiciones de alta transpiración (Yeo et al., 1987; Yadav et al., 1996). No obstante, esa propuesta se ha descartado para *Arabidopsis* en base a la inhibición que ejerce el Ca^{2+} en la entrada neta de Na^+ en esta especie (Essah et al., 2003), algo que no ocurre en arroz (Yeo et al., 1985).

Otra hipótesis sobre la entrada de Na^+ se basa en la similitud que tiene con el K^+ , la cual permitiría que el Na^+ fuera transportado por transportadores destinados a la nutrición de K^+ . Sin embargo, por lo que se conoce hasta el día de hoy, las vías principales de absorción de K^+ por la raíz, las constituyen los transportadores tipo HAK y los canales tipo AKT y estos transportadores se caracterizan por una alta selectividad por K^+ frente a Na^+ (Rubio et al., 2008, 2010). De forma general, los canales tipo Shaker KAT presentan una gran discriminación de K^+ frente a Na^+ . No obstante se ha descrito en protoplastos de raíces de trigo la capacidad de estos KATs para el transporte de Na^+ (Tyerman et al., 1997).

Por otro lado, también se ha descrito la expresión en raíces y hojas de trigo de un transportador denominado LCT1 (low affinity cation transporter). Este transportador complementa a mutantes de levadura deficientes en la nutrición de K^+ (Schachtman et al., 1997) y parece capaz de mediar el transporte de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} . Sin embargo, el hecho de que no se parezca a ningún otro gen de transportador iónico conocido y el que no se haya descrito un papel fisiológico en la planta hacen que este transportador no haya sido considerado en la literatura más reciente.

Otra hipótesis es la que implicaría la entrada de Na^+ a través de simportes específicos de entrada de moléculas esenciales para la célula. Algunos simportes son conocidos y podrían existir más de los que se conocen. En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha propuesto un cotransporte de fosfato con Na^+ a pH alcalino (Roomans et al., 1977). También se ha descrito el transporte de fosfato dependiente de Na^+ en el hongo marino *Thraustochytrium roseum* (Siegenthaler et al., 1967) y un simporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ en la cianobacteria *Anabaena variabilis* para el suministro de una fuente de carbono inorgánico proveniente del exterior (Kaplan et al., 1984). Otro ejemplo está en la toma de nitrato y urea

dependiente de Na^+ para la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* (Rees et al., 1980). Por último, en plantas terrestres, se ha descrito para la especie C4 *Panicum miliaceum* una entrada de piruvato al cloroplasto acoplada a la entrada de Na^+ (Ohnishi and Kanai, 1987) y se ha sugerido la existencia de un transportador Na^+/Pyr que podría estar determinado por el gen *BASS2* de membrana de cloroplasto de especies C4 (Furumoto et al., 2011). La extraordinaria capacidad de adaptación de las células a lo largo de la evolución hace que esta vía de entrada de Na^+ que mediaría la toma de nutrientes no pueda descartarse.

Todo lo anterior se refiere a vías de entrada identificadas. Sin embargo, hoy en día, la teoría más popular sobre la entrada de Na^+ en la planta es la que implica a canales catiónicos no selectivos (NSCC) que no están bien identificados o que no lo están en absoluto (Amtmann et al., 1999; Demidchik et al., 2002; Demidchik and Maathuis, 2007). Dentro de estos NSCCs, se han postulado dos candidatos de características similares en cuanto a la baja selectividad por cationes monovalentes y a que son independientes del voltaje y sensibles a la presencia de Ca^{2+} . Se trata de los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGCs) (Maathuis and Sanders, 2001) y los canales activados por glutamato (GLRs) (Tester and Davenport, 2003).

Sin embargo, la implicación de los NSCCs es una hipótesis controvertida y algunos autores consideran débiles las evidencias que las soportan. Una de las críticas sobre la capacidad de los NSCCs de mediar la entrada de Na^+ en condiciones fisiológicas es que en las técnicas de patch-clamp donde se describieron, entre un 60 y un 80% de las corrientes de entrada de Na^+ generadas por estos canales parecen inhibirse a concentraciones de Ca^{2+} mayores de 0.5 mM, situación habitual en muchos suelos (Schachtman and Liu, 1999). La polémica es muy extensa y ha sido revisada críticamente por Kronzucker y Britto (2011).

En paralelo con lo anterior, utilizando $^{22}\text{Na}^+$ se identificaron flujos de entrada y salida de Na^+ extremadamente rápidos que sugieren que la planta soporta un problema de excesiva permeabilidad al Na^+ que conlleva un reciclado fútil de Na^+ (Britto and Kronzucker, 2006). Sin embargo, se ha descrito posteriormente que en estos trabajos los flujos estimados con $^{22}\text{Na}^+$ son muy superiores a los reales ya que también se midieron los intercambios entre apoplasto y medio externo (Britto and Kronzucker, 2009; 2015;

Kronzucker and Britto, 2011). A pesar de las controversias, las observaciones descritas han llevado a la idea dominante de que, en las plantas en condiciones salinas, existe una entrada de Na^+ excesiva e inevitable.

1.2.2. Salida de Na^+ y recuperación del Na^+ xilemático

Una vez en las células de la raíz, además de acumularse, el Na^+ puede seguir dos procesos muy diferentes, ser expulsado de nuevo al medio externo o ser cargado a los vasos del xilema y transportado a la parte aérea de la planta. Aunque probablemente son bastantes los transportadores que intervienen en los flujos a través de membranas plasmáticas que están implicados en el proceso global, solo se conocen dos de estos transportadores con relativa precisión: SOS1 y HKT1.

SOS1 (salt-overly sensitive) es un antiportador Na^+/H^+ que moviendo el Na^+ al exterior de las células de la raíz participa en dos procesos que operan en sentidos opuestos para la raíz de la planta. Por una parte, SOS1 media la salida de Na^+ citosólico al medio externo (Pardo et al., 2006) en un proceso que es común con briofitas (Fraile-Escanciano et al., 2016). Por otra parte, SOS1, carga Na^+ desde el simplasto de las células en el xilema (Huazhong Shi et al., 2002; Katschnig et al., 2015). En principio las dos funciones son iguales y solo se distinguen por la cara del simplasto radicular en la que operan, hacia el exterior (incluyendo el apoplasto) o hacia los vasos del xilema.

Además de la identificación de SOS1, también se ha identificado la ruta de señalización SOS que es crucial para la regulación de la función de SOS1. Esta ruta se induce por estrés salino, por mecanismos que están aún por determinar totalmente (Xiong et al., 2002). La señal de salinidad produce un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelulares lo que origina la activación del complejo proteína-kinasa SOS2/SOS3. SOS3, una proteína miristoilada y de unión a Ca^{2+} (Ishitani, 2000) activa a SOS2, una proteína kinasa (Halfter et al., 2000; Liu et al., 2000) que fosforila y activa a SOS1 (Quintero et al., 2002). Se ha descrito que este complejo es capaz de aumentar los niveles de expresión de SOS1 (Shi et al., 2000) así como de activar una ruta que conduce a aumentar la actividad del transportador SOS1 en estrés salino (Qiu et al., 2002) aumentando la salida de Na^+ del citoplasma hacia el exterior. Este complejo podría también estar implicado en la regulación de la actividad de otros transportadores como por ejemplo HKT1 (Rus et al.,

2001) ó NHX1 vacuolar (Qiu et al., 2004). Además, se ha descrito su participación en procesos como el mantenimiento de la integridad de la pared celular a través de nuevos componentes de la ruta identificados (Mahajan et al., 2008) y de desarrollo y floración (Kim et al., 2013) por interacción con el factor de transcripción GIGANTEA.

Adicionalmente, existen otras rutas de señalización de estrés salino en plantas en las que intervienen especies reactivas de oxígeno (ROS), inositoles fosfatos (IFs) y diversas hormonas como el ácido abscísico (ABA), el etileno y el ácido salicílico (SA) (Xiong et al., 2002).

HKT1, es un transportador que recupera Na^+ desde el xilema hacia el simplasto de las células de la raíz (Berthomieu et al., 2003; Rus et al., 2004, 2006). Esta función es antagónica a la de SOS1, de tal manera que una actividad débil de HKT1 conlleva una carga alta de Na^+ en la parte aérea mientras que una actividad fuerte conlleva un menor contenido de Na^+ en la parte aérea.

En *Arabidopsis*, los genes que determinan estos dos transportadores han sido ampliamente estudiados. Se han clonado en sistemas heterólogos donde se han caracterizado funcionalmente (Uozumi et al., 2000; Quintero et al., 2002) y se han identificado las correspondientes líneas mutantes que han sido posteriormente utilizadas para estudiar la función de los transportadores SOS1 y HKT1 en la distribución de Na^+ en la planta (Davenport et al., 2007). Así, los mutantes de estos genes en *Arabidopsis* constituyen herramientas muy útiles para estudiar los movimientos de Na^+ en la planta.

1.2.3 Compartimentación intracelular del Na^+

Una vez en las células de la planta, el Na^+ puede ser eliminado del citoplasma, donde es tóxico acumulándose en la vacuola, donde se supone que la toxicidad es mínima. Probablemente, esta compartimentación intracelular es el principal componente de la tolerancia tisular y parece constituir una de las principales estrategias de tolerancia (Munns and Tester, 2008b; Shabala, 2013; Maathuis, 2014) de las plantas al NaCl. Algunas extremohalofitas pueden llegar a soportar concentraciones de Na^+ en los tejidos, de hasta 500 mM (Cheeseman, 2013). No obstante hay autores que critican la idea de una

gran exclusión de Na^+ del citosol en las plantas halófilas (Cheeseman, 2013; Kronzucker and Britto, 2011).

Independientemente de que algunas plantas compartimenten más Na^+ que otras, poco se conoce de esta estrategia de acumulación de Na^+ en la vacuola y aún menos sobre los transportadores implicados en los procesos de compartimentación intercelular del Na^+ . Hasta ahora, el transportador más importante descrito que podía mediar el secuestro del Na^+ en vacuolas era el antiportador Na^+/H^+ NHX1 de tonoplasto (Apse et al., 1999). NHX1 pertenece a los denominados CPA1 (monovalent cation/ H^+ antiporters) y se expresa en la membrana del tonoplasto. Este transportador parece ser capaz de transportar Na^+ ó K^+ (Venema et al., 2002) dentro de la vacuola utilizando para ello el gradiente de protones generado por la ATPasa vacuolar. Sin embargo, en la actualidad algunos estudios cuestionan la acumulación de Na^+ en la vacuola por parte de este transportador, que podría estar encargado del almacenamiento activo de K^+ (Leidi et al., 2010; Barragán et al., 2012; Andrés et al., 2014; De Luca et al., 2018), además de tener un papel significativo en la homeostasis del pH y tráfico vesicular (Brett et al., 2005; Bassil and Blumwald, 2014). El secuestro de Na^+ en otros orgánulos distintos de la vacuola también ha sido descrito para el cloroplasto. Aquí, el transportador que mediaría ese transporte pertenece a la familia de los antiportadores CHXs (cation/ H^+ eXchanger) y se sugiere su implicación en aspectos como el desarrollo del cloroplasto y la tolerancia a la salinidad mediante la homeostasis del pH citosólico y del estroma (Song et al., 2004).

1.3 Discrepancias con el modelo de toxicidad del Na^+

En el modelo de toxicidad que está más ampliamente aceptado, la planta sufre inhibición del crecimiento y prematura senescencia porque el Na^+ es inevitablemente acumulado en el citoplasma de las células de las hojas y en ellas ejerce su acción tóxica (Horie et al., 2009; Hauser and Horie, 2010). Sin embargo, actualmente, este modelo empieza a cuestionarse debido a que no integra componentes tan importantes en la respuesta de la planta a la salinidad como son la tolerancia tisular y el efecto osmótico (Møller and Tester, 2007a; Rahnama et al. 2010; Jha et al., 2010; Flowers et al., 2015; Munns et al., 2016). Como ya se ha dicho, la toxicidad celular por Na^+ recae principalmente en que los iones de Na^+ inhiben la actividad de multitud de enzimas. Esto ocurre por dos causas: la primera, por la alta ratio carga/masa comparada con el K^+ , que crea perturbaciones en el

balance de los enlaces hidrofóbicos y electrostáticos que mantienen la estructura proteica; La segunda, por inhibición de la función enzimática al unirse directamente a sitios de inhibición en las enzimas o por desplazamiento del K^+ de sitios de activación enzimáticos (revisado en Amtmann et al., 1998). No obstante parece haber cierta controversia al respecto de la inhibición enzimática por Na^+ y hay autores que proponen que los enzimas en general son igualmente sensibles o tolerantes al K^+ y que no se conocen unos niveles de Na^+ que sean inaceptables para la célula desde el punto de vista bioquímico (Cheeseman, 1988).

Ya en la década de los años 40 diversos autores había estudiado la adaptación osmótica de la planta en condiciones de salinidad y el papel que el Na^+ jugaba en estos procesos (Bernstein, 1961; 1963; 1975; Hsiao et al., 1976) Esta función osmótica del Na^+ cuestionaba la idea de su supuesta toxicidad y este cuestionamiento sigue presente, se cita textualmente: “el folclore fisiológico ha elevado la toxicidad del Na^+ a una idea de evasión paranoica del Na^+ citoplásmico” (Cheeseman, 1988; 2013).

La noción de toxicidad asociada a la presencia de Na^+ en el citoplasma se originó a partir de estudios con células animales (Steinbach, 1962) las cuales evolucionaron en ambientes salinos y son eficaces exclusoras de Na^+ . Posteriormente dicha noción se extendió a las células de plantas (Evans and Sorger, 1966) hasta nuestros días sin prestar demasiada atención a las características especiales que las plantas adquirieron durante la adaptación a los distintos ambientes donde evolucionaron. De hecho, el surgimiento de la vida terrestre y la evolución de las plantas desde briofitas a plantas vasculares con flores ocurrió en el precámbrico (Heckman et al., 2001) en ambientes que en contraste con el medio marino, el K^+ era escaso porque se liberaba de las rocas por lentos procesos de meteorización (Algeo, 1998). En estos ambientes oligotróficos, el Na^+ pudo parcialmente sustituir las funciones del K^+ en hongos y plantas. Este escenario explicaría las observaciones de una entrada de Na^+ de alta afinidad en las raíces de varios cereales (Garcia-deblas et al., 2003) cuyas características cinéticas y de inhibición son similares a la de algunos transportadores HKT cuando se expresan de forma heteróloga en mutantes de levadura. También explicaría la existencia de los transportadores de alta afinidad de Na^+ de algunas plantas. Algunos de estos transportadores han sido bien caracterizados y sugieren que la entrada de Na^+ tiene significado fisiológico porque puede sustituir al K^+

en algunas de sus funciones (Rodríguez-Navarro and Rubio 2006; Haro et al., 2010; Benito et al., 2012; Schulze et al., 2012).

En resumen, la existencia de transportadores específicos de Na^+ cuestiona el alto énfasis que se da a la idea del Na^+ tóxico, ya que estos no otorgarían una ventaja fisiológica si el Na^+ no pudiera sustituir una parte del K^+ celular.

Esta conclusión se suma a la ya explicada del papel osmótico del Na^+ . Así, contraria a la idea de inevitabilidad en la absorción del Na^+ también está la noción ya explicada de que las plantas expuestas a condiciones salinas usan una entrada y acumulación de Na^+ rápida para compensar el potencial hídrico negativo del suelo creado por las sales. La existencia de este ajuste está ampliamente aceptado en las especies halófilas (Flowers et al., 1977; 2015) pero esta función osmótica del Na^+ sobre los efectos de la salinidad en las glicofitas estuvo casi ausente de la literatura durante más de 30 años. Aunque actualmente la idea se empieza a recuperar (Pardo and Quintero, 2002; Cuin et al., 2009; Flowers et al., 2015; Genc et al., 2016;), todavía se mantiene la idea de que un estrés salino conlleva, necesariamente, un déficit hídrico en la planta (Munns, 2002; Hasegawa, 2013). A la vez, un buen número de observaciones cuestionan la imperativa exclusión de Na^+ del citosol como un dogma para las células de las plantas, lo que viene a demostrar la falta de un modelo claro que explique el estrés por NaCl y la tolerancia a la salinidad (Cheeseman, 2013; Kronzucker et al., 2013).

Una explicación de las discrepancias actuales sobre los modelos concretos de adaptación de las plantas a ambientes salinos, a pesar de la cantidad de información disponible, está en la variabilidad en las estrategias que las diferentes plantas han desarrollado para re-adaptarse a la salinidad ya que originalmente evolucionaron en un medio no salino (Flowers et al., 2010; Bennett et al., 2013; Rozema and Schat, 2013). Por ello, una aproximación paralela al estudio detallado de muchas especies de plantas es intensificar el estudio sobre unas pocas especies, para así construir modelos completos que posteriormente puedan adaptarse a las características de otras plantas. En este sentido, se lleva años trabajando en el estudio de *Eutrema salsugineum*, (conocida como *Thellungiella halophila* y más tarde como *Thellungiella salsugineum*), una pariente evolutiva de *Arabidopsis* pero de naturaleza halófila que cuenta con un 90-95% de identidad de secuencia génica entre ambas. Esto, la ha convertido en una fuente de estudio

para la tolerancia a la salinidad (Bressan et al., 2001; Zhu, 2001) muy rentable desde el punto de vista genético.

1.4 Arabidopsis como modelo

Ya se ha comentado la conveniencia de buscar modelos y estudiarlos en profundidad. A estos efectos Arabidopsis es una planta ideal, por su gran uso como planta modelo en otros aspectos, sus amplios recursos a la hora de realizar estudios genéticos y moleculares, y la gran variabilidad natural en la tolerancia al NaCl entre las accesiones (Labidi et al., 2002; Rus et al., 2006). No obstante, esta elección lleva a que nos preguntemos si la tolerancia al Na⁺ en Arabidopsis puede usarse como modelo para plantas cultivadas (Zhu, 2000; Møller and Tester, 2007). Esta pregunta es claramente relevante porque, si el modelo incluye muchos detalles, el número de plantas que respondan al modelo de Arabidopsis podría ser bajo. Merece la pena insistir en que la adaptación de las plantas a suelos con alto contenido en Na⁺ ocurrió en la última etapa de la evolución de muchas plantas terrestres y de forma independiente en diferentes taxones (Flowers et al., 2010; Bennett et al., 2013;; Rozema and Schat, 2013). Así, el uso de Arabidopsis como modelo en la tolerancia a la salinidad debería referirse a efectos generales y a movimientos y distribución de Na⁺, pero no a cada detalle del proceso involucrado.

El uso de Arabidopsis como planta modelo para estudiar la respuesta a la salinidad ha llevado a un número considerable de contradicciones que están asociadas a diferencias en el concepto mismo de tolerancia y en los procedimientos para cuantificarla. Así, a lo largo de décadas, se han utilizado y se siguen utilizando un gran número de ensayos diferentes para evaluar la tolerancia a la salinidad: tiempo de supervivencia o muerte de plantas (Rus et al., 2006; Katori et al., 2010a;) o de plántulas (Ren et al., 2010); aumento de peso seco en pocos días (Moller et al., 2009; Jha et al., 2010) o tras semanas de tratamiento con NaCl (Kaddour et al., 2010); germinación en altas concentraciones de NaCl (Quesada et al., 2002); contenido en agua (Jha et al., 2010) y probablemente más. Otros estudios con diversas accesiones de la especie se encaminaron a encontrar genes responsables de la tolerancia a la salinidad (Rus et al. 2006; Baxter et al., 2010; Buescher et al., 2010; Jha et al., 2010; Katori et al., 2010;). En estos estudios se identificaron algunas accesiones tolerantes. Sin embargo, los resultados han sido contradictorios, dependiendo de la aproximación. Por ejemplo, *Ler* puede ser más (Jha et al., 2010) o algo menos (Labidi et

al., 2002) tolerante al Na^+ que Col-0 y Ts-1 puede ser más (Rus et al., 2006) o menos tolerante al Na^+ (Katori et al., 2010) que Col-0. Con estos ejemplos, se concluye que la metodología de evaluación de la tolerancia a la sal es muy importante a la hora de establecer modelos de estudio y que estos deben de ser cuidadosamente seleccionados si se quiere que coincidan con el concepto de tolerancia usado en la producción de cultivos agrícolas.

1.5 Objetivos del presente trabajo

En este trabajo nos hemos propuesto evaluar la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a la salinidad persiguiendo una información que pueda extrapolarse a las plantas cultivadas. Para ello se necesita la puesta a punto de un sistema experimental que nos permita simular las condiciones de salinidad que soportan las plantas sin exponerlas a altas concentraciones de NaCl que comprometan su supervivencia. Apoyados en este sistema experimental se proponen los siguientes objetivos:

- Caracterización fisiológica de la acumulación de Na^+ durante el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, en condiciones de salinidad moderada y donde se puedan separar los efectos tóxicos y osmótico del NaCl y así discriminar como afectan cada uno de ellos a la planta.
- Caracterización fisiológica de la entrada de Na^+ en *Arabidopsis*, donde se pretende identificar los mecanismos implicados en mediar la toma de Na^+ en la raíz.

Para ampliar nuestro estudio en ambos objetivos se utilizarán diferentes accesiones de *Arabidopsis* así como la planta halófila. *Eutrema salsugineum* relacionada filogenéticamente con *Arabidopsis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Antibióticos, enzimas y reactivos

Los antibióticos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, Inc y Roche Biochemicals (Merck KGaA, Darmstadt, German). Los enzimas de restricción proceden de Roche Biochemicals (Merck KGaA, Darmstadt, German, al igual que las enzimas fosfatasa alcalina de gamba, y la T4 DNA ligasa. Los reactivos proceden de Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Germany); Honeywell Fluka™ (Honeywell International Inc (Buchs, Switzerland); Panreac AppliChem (ITW Reagents, Barcelona, Spain); Invitrogen (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA); Bio-Rad Laboratories, Inc (Richmond, CA, USA), Pronadisa (Madrid, Spain) y Duchefa-Biochemie B.V. (Haarlem, The Netherlands). Las enzimas DNA polimerasa fueron: “Taq DNA polymerase”, “Expand High Fidelity PCR System” de (Roche Biochemicals), y “Pfu DNA polymerase” de Stratagene, (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA).

2.2 Material biológico

2.2.1 Bacterias y condiciones de crecimiento

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α se usó rutinariamente para la propagación de plásmidos cultivándose en medio LB a 37 °C (Sambrook et al, 1989). La estirpe de *coli* TKW4205 defectiva en los principales sistemas endógenos de captación de K⁺ se cultivó de forma rutinaria en medio LB suplementado con 50 mM KCl (LBK). Para los ensayos de complementación con esta cepa se usó el medio mínimo sólido (MM que contenía 5 mM H₃PO₄, 0,4 mM MgSO₄, 6 μ M FeSO₄, 1 mM ácido cítrico, 1 mg l⁻¹ biotina, 0,2% glicerol, 8 mM asparagina, 20 mM CaCl₂. El medio se suplementó con los oligoelementos descritos en (Rhoads et al, 1976) y se ajustó a pH 7,5. Para los ensayos a pH 4,5 se tamponó el medio con 5 mM ácido tartárico.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se describen en Tabla M1. Asimismo, se indican la procedencia y características de los plásmidos utilizados.

2.2.2 Levaduras y condiciones de crecimiento

La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* AXT3K deficiente en los sistemas de salida de Na^+ ENA1-4 y NHA1 y en el antiportador vacuolar $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ NHX1, y la cepa MA5 deficiente en los sistemas de entrada de K^+ TRK1 y TRK2 y en los sistemas de salida de Na^+ ENA1-4 y NHA1, se utilizaron para la caracterización funcional de posibles transportadores de salida de Na^+ y de entrada de K^+ respectivamente. AXT3K presenta un fenotipo de no crecimiento en presencia de altas concentraciones de Na^+ . MA5 presenta un fenotipo de no crecimiento a bajas concentraciones de K^+ .

Las cepas de *Saccharomyces* se cultivaron en medio YPD (Sherman, 1991) o en medio mínimo SD (Sherman, 1991), suplementando con los aminoácidos y nucleótidos que fueran necesarios para el crecimiento de la levadura, excluyendo el compuesto correspondiente al marcador de auxotrofia. Para el crecimiento del mutante MA5, siempre se suplementaban a los medios de cultivo con 30 mM KCl. En los ensayos de crecimiento bien en sólido o en líquido, se cultivaron las cepas en medio mínimo Fosfato de Arginina (PA) (Rodríguez-navarro and Ramos, 1984) suplementado con 2% glucosa y 1% de solución vitamínica (4% ácido nicotínico, 4% piridoxal, 4% tiamina, 4% pantoneato, y 20 mg/l biotina) además de los aminoácidos o nucleótidos correspondientes según los marcadores de auxotrofia que tuviese la cepa a cultivar. El pH del medio se ajustaba a 6,5. Los cultivos inoculados con las levaduras se incubaban una noche a 28° C con agitación.

A partir de ahora, cuando nos refiramos al medio PA, consideramos el medio completo con su correspondiente concentración de glucosa y vitaminas más los aminoácidos necesarios excluyendo los correspondientes a los marcadores de auxotrofia del plásmido transformado.

Para los experimentos de crecimiento a distintos pHs, el PA se tamponó con ácido tartárico 5 mM (para pHs de 4,5 y 5,0) o con 10 mM HEPES (para pH 7,5). Los ensayos de crecimiento en matraces de los transformantes que expresaban *AtSOS1* y *EsSOS1* se realizaron incubando los matraces a 28°C con agitación durante 24 horas.

En los experimentos de expresión heteróloga en levaduras, se utilizó el plásmido pYPGE15, mientras que en los experimentos de expresión heteróloga en bacterias se utilizó el plásmido pBAD24 (Tabla M1).

Tabla M1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo. ^a Todas las cepas de bacteria pertenecen a la especie *Escherichia coli*. ^b Todas las cepas de levadura pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

	Genotipo/Características relevantes	Fuente y/o referencia
Bacterias^a		
DH5α	<i>F⁻ endA1⁻ hsdR17(rK⁻ mK⁺) supe44 thi-1 lambda⁻ recA1 gyrA96 realA1 80dlacZAM15</i>	Hanahan, 1983
TKW4205	<i>thi rha lacZ nagA recA Sr::Tn10 ΔkdpABC5 trkA405 kup1</i>	Schleyer and Bakker, 1993
Levaduras^b		
AXT3K	<i>ena1 Δ::HIS3::ena4 nha1 Δ::LEU2, nhx1 Δ::KanMX4</i>	Quintero et al. 2002
MA5	<i>Mat a ade2 ura3 trp1, trk1Δ::LEU2, trk2Δ::HIS3, ena1-4Δ::HIS3, nha1Δ::LEU2</i>	Benito et al. 2004
Plásmidos		
pCR-Blunt II-TOPO	Plásmido multicopia de bacterias para la clonación de productos de PCR. KmR	Invitrogen
pCR-XL-TOPO	Plásmido multicopia de bacterias para la clonación de productos de PCR. KmR	Invitrogen
pYPGE15	Plásmido multicopia de expresión en levaduras. Promotor PGK, terminador CYC	Brunelli and Pall, 1993
pBAD24	Plásmido multicopia de expresión condicional en bacterias. Promotor PBAD, regulador araC dependiente de	Guzmán et al, 1995

2.2.3 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *gll*, *gll sos1-1* (Wu et al., 1996), *gll hkt1-4* (Rus et al., 2004) y *nrt2.5* proceden de los laboratorios de los doctores José Manuel Pardo y Francisco Javier Quintero. Las semillas de las accesiones de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh proceden de los laboratorios de los doctores Carlos Alonso-Blanco y Rhonda Meyer. Las semillas de las líneas RILs con parentales Col-0 x C24 y C24 x Col-0 proceden del laboratorio de la Dra. Rhonda Meyer. En la tabla M2 se detallan las diferentes accesiones de *A. thaliana* y líneas RILs que se han estudiado en este trabajo. Las semillas de los mutantes *hak5* y *skor* proceden del laboratorio del Dr. Francisco Rubio. Las semillas del mutante *slah2-3* y su correspondiente fondo genético Col-3 proceden del laboratorio del Dr. José Manuel Colmenero-Flores. Las semillas del mutante *nrt1.5-1* proceden del laboratorio de la Dra. Yi-Fang Tsay. Las semillas del mutante *nrt1.8* proceden del laboratorio del Dr. Jiming Gong. Las semillas de *Eutrema salsugineum* ecotipo Shandong y las de RNAi *EsSOS1* proceden del laboratorio de la Dra. Karen Shumaker. Las semillas que detallo a continuación se obtuvieron a partir del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC): mutantes *nrt1.1* en el fondo silvestre Col-0 (N6384) y Ler (N201 y N6154); *nrt1.2*

(N675718 and N673899). N6384 and N675718 corresponden a *chl1-5* (Tsay et al. 1993) y *ntl1/ait1-2* (Ondzighi-assoume and Harris, 2016); *nrt2.4* (N694415) y *nrt2.4-2* (N872100); *nrt2.6-1* (N121890); *sultr1;2* (N868909) y *sultr3;5* (N867234) y otro alelo mutante *nrt1.5* (N662256).

Tabla M2. Accesiones de *A.thaliana* y líneas RILs estudiadas

Accesiones de <i>A. thaliana</i>				
Ak-1	Bay-0	Bch-1	C24	Col-0
Doñ-0	Fei-0	Ler	Ll-0	Nd-1
Sha	Ts-1	Tsu-1	Ws	Nok-2
Cvi	Ped-0	Bu-5		
RIL's (Col x C24) y (C24 x Col-0)				
Q088	Q153	R013	Q007	Q147
Q121	R041	Q009	R008	Q153
Q192	R063	R006	Q113	R103
Q047	R075	Q068	Q108	Q005
Q117	R148	Q016	R161	Q080
Q129	R161	Q138	Q181	R105
R114	R059			

2.2.3.1 Esterilización y estratificación de semillas de *Arabidopsis* y *Eutrema*

La superficie de las semillas se esterilizó mediante un lavado de 5 minutos con lejía comercial seguido de 3 lavados consecutivos con agua estéril de calidad MilliQ (H₂Omq), procedente de aparato Milli-Q-Plus 185 Millipore (Molsheim, France) libre de Na⁺ y K⁺. Las semillas estériles se mantuvieron en 0,5 ml de H₂Omq durante 48 h a 4°C y oscuridad para su estratificación o se sembraron en placas estratificándose posteriormente las placas sembradas.

2.2.3.2 Crecimiento en medio hidropónico

Las semillas previamente esterilizadas y estratificadas se sembraron en un soporte patentado por la casa comercial Araponics (Araponics NV, Liege, Belgium), <http://www.araponics.com> que se había rellenado con agarosa al 0.6% previamente lavada para eliminar parte del Na⁺. El lavado de la agarosa se realizó mediante la agitación

con una solución que contenía 5 mM KCl y 5 mM MgCl₂ durante dos horas seguido de tres lavados con H₂Omq para eliminar los restos de cationes. Las semillas sembradas en los soportes se emplazaron en unos contenedores de la misma marca Araponics, que contenían un medio nutritivo de crecimiento de plantas diseñado en base al utilizado en (Alemán et al. 2009), con algunas modificaciones. En concreto dicho medio contiene 1,4 mM Ca(NO₃)₂, 0,2 mM MgSO₄, 0,2 mM H₃PO₄, 1 mM KCl, 25 μM H₃BO₃, 20 μM Fe-EDTA (a partir de H₄EDTA), 2 μM MnSO₄, 2 μM ZnSO₄, 0,5 μM CuSO₄ y 0,5 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄. El pH se ajustó a 5.7 con Ca(OH)₂. El contenido en Na⁺ residual de este medio era de entre 2 y 3 μM. Dependiendo del ensayo realizado, el medio de crecimiento se suplementaba con 0,2 mM NaCl. Los contenedores sembrados se emplazaron en cámaras de crecimiento CONVIRON MTR30 (Conviron E15; Controlled Environments Ltd., Winnipeg, Manitoba, Canada), con un ciclo de 16/8 h luz/oscuridad a 23 °C y 65% humedad y con una irradiancia de 110-120 μmol m⁻² s⁻¹. El medio de crecimiento se reemplazó cada semana.

2.3 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

2.3.1 Aislamiento y manipulación de DNA plasmídico

El aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos se realizó siguiendo protocolos estándar (Sambrook et al, 1989) o bien siguiendo las instrucciones del fabricante en el caso de utilizar “kits” comerciales.

En el caso de obtención de preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala a partir de bacterias se llevó a cabo por dos métodos. Para el análisis de clones, se siguió el método de lisis alcalina y ebullición (Sambrook and Russell, 2001). Para la obtención de DNA plasmídico a gran escala se utilizó el método de Maxiprep de lisis alcalina descrito en Sambrook et al, 1989. Para la secuenciación de fragmentos de DNA se utilizó el “QIAprep spin miniprep kit” (QIAGEN). En los casos en que se hizo necesario aislar bandas de geles de agarosa se utilizó el “Gene Clean Turbo Kit” (Q-biogene).

La concentración de DNA obtenido se estimó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) así como mediante la comparación de las intensidades de las bandas de DNA separadas por electroforesis en geles de agarosa TBE al 0,8% (p/v) y

teñidas con bromuro de etidio con el patrón de bandas λ *Hind*III (fago λ cortado con la enzima de restricción *Hind*III).

Los experimentos de PCR se realizaron en un termociclador “GeneAmp 2400” (Perkin-Elmer), haciendo uso de distintas DNA polimerasas. Las reacciones de PCR se hicieron siguiendo las recomendaciones de las instrucciones de los fabricantes y se utilizaron como cebadores oligonucleótidos sintetizados por Sigma-Aldrich. La longitud de los fragmentos de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

2.3.2 Transformación de bacterias y levaduras

Para la transformación de *Escherichia coli* se prepararon células competentes mediante el procedimiento de permeabilización celular con CaCl_2 siguiendo el protocolo descrito en (Sambrook et al, 1989). Para la transformación de células de levadura se siguió el procedimiento de permeabilización celular con PEG4000 descrito en (Elble, 1992). Se realizaron las transformaciones de bacterias y levaduras que se muestran en la Tabla M3

Tabla M3. Transformaciones de bacterias y levaduras realizadas en este trabajo.

^a Medios de selección de los transformantes, A significa Adenina y T triptófano

Cepa Bacteria	Plásmidos con los que se ha transformado	^a Selección
TKW4205	pBAD	LBK ⁺ + Amp
TKW4205	pBAD- <i>Es</i> SOS1	
TKW4205	pBAD- <i>At</i> SOS1	
Cepa Levadura		
AXT3K	pYPGE15	SD+A+T
AXT3K	pYPGE15 + pFL32T (<i>At</i> SOS2- <i>At</i> SOS3)	SD+A
AXT3K	pYPGE15- <i>Es</i> SOS1 + pFL32T (<i>At</i> SOS2- <i>At</i> SOS3)	SD+A
AXT3K	pYPGE15- <i>At</i> SOS1 + pFL32T (<i>At</i> SOS2- <i>At</i> SOS3)	SD+A
MA5	pYPGE15	SD+A+T+ K ⁺
MA5	pYPGE15 + pFL32T (<i>At</i> SOS2- <i>At</i> SOS3)	SD+A+ K ⁺
MA5	pYPGE15- <i>Es</i> SOS1 + pFL32T (<i>At</i> SOS2- <i>At</i> SOS3)	SD+A+ K ⁺
MA5	pYPGE15- <i>At</i> SOS1 + pFL32T (<i>At</i> SOS2- <i>At</i> SOS3)	SD+A+ K ⁺

2.3.3 Subclonaje de cDNA de *EsSOS1* y *AtSOS1* en vectores de expresión de bacteria y levadura

El DNA plasmídico que contenía el cDNA de *EsSOS1.15* en el vector Topo XL fue obtenido y donado por el laboratorio de la Dra. Karen Schumaker de la Universidad de Arizona. Una vez recibido se transformó en la cepa DH5 α para su mantenimiento y propagación. El subclonaje se realizó mediante doble digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *SphI*, para su posterior ligación en los vectores de expresión pBAD y pYPGE15 previamente digeridos con *KpnI* y defosforilados con fosfatasa alcalina. El DNA plasmídico que contenía el cDNA de *AtSOS1* en el vector de expresión Topo-PCR BluntII y que fue cedido a nuestro laboratorio por el Dr. Fco. Javier Quintero del CSIC, se digirió con las enzimas de restricción *XbaI*, *KpnI* y *SmaI* y se ligó en el vector de expresión de levadura pYPGE15 previamente digerido con las enzimas *XbaI* y *KpnI*. Nuestro laboratorio ya contaba con el vector de expresión en bacteria pBAD que contenía el cDNA de *AtSOS1* (Garcia-deblás et al., 2007) y también contaba con el vector de expresión en levadura pFL32T que contenía el cDNA de *AtSOS2* y *AtSOS3* que había sido generado y cedido por el Dr. Fco. Javier Quintero. Con estas construcciones se procedió a la transformación de las cepas arriba descritas.

2.3.4 Análisis de genotipado de los mutantes de *Arabidopsis*

Para el aislamiento de DNA genómico de plantas se utilizó el kit “Phire Plant Direct PRC Master Mix” (ThermoScientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de una pequeña porción de tejido vegetal de una hoja joven que se homogenizó en el tampón suministrado en dicho kit. Se tomó 0.5 μ L del homogenizado y se añadió a 5,0 μ L de una solución (MM green) de amplificación suministrada con los reactivos. Para la reacción de PCR se añadió oligonucleótidos a una concentración de 10 μ M y H₂O hasta un volumen final de 10 μ L. Los experimentos de PCR se realizaron en un termociclador “GeneAmp 2400” (Perkin-Elmer). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Tabla M4). La longitud de los fragmentos de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE

2.3.5 Aislamiento y purificación de RNA de tejido vegetal

Muestras de raíces previamente congeladas y mantenidas a -80°C se pulverizaron con ayuda de un mortero y el RNA total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Thermofisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar el DNA genómico de las muestras, el RNA se trató con DNasa I (Roche) durante 15 minutos a 37°C y se purificó con columnas del Kit “Nucleo Spin RNA clean-up” (Macherey-Nagel). Una primera cuantificación de integridad del RNA se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 200 (Thermo Scientific) y mediante la visualización de las bandas de RNA ribosomales en geles de agarosa. Una cuantificación y análisis de calidad más precisas se realizaron en el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent) de la unidad de genómica del CNB. Nueve muestras correspondientes a tres réplicas de ensayos biológicos destinadas a secuenciación a gran escala se enviaron a la compañía BGI (<https://www.bgi.com/global/>) para su secuenciación masiva.

Tabla M4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Oligonucleótido 5' - 3'	Observaciones
NRT1.5-F	TAGGAAAGTGACAATAGAAC	Genotipado de plantas mutantes en sistemas de transporte
NRT1.5-R	TGTTCCGTGTTTCGTCAAGATGATG	
NRT2.6-1-F	TCAAACCACTATCATTCGCTAAACC	
NRT2.6-1-R	GAACGGCGGGAAACAAAAGGAG	
NRT2.6-1-R2	TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGT	
NRT2.4-F	GTGTTGCTTCTGTCTCTGGC	
NRT2.4-R	CATACCAAAGCTTGCCGCGA	
NRT2.4-R2	CCTAAGGAGCGGCGTGAG	
SULTR1.2-F	GTGCTCACTTTGGCTCCAG	
SULTR1.2-R	CGAACCAGGAGAAAGGATAGAGA	
SULTR3.5-F	CATAACGGGCTTCATGGGC	
SULTR3.5-R	CGGCCTTAAACACCATCCC	
AIT1-LP2	TTTTCTCCTAGCTCTCCTCGG	
AIT1-RP2	TGACAAGGAGATTATAAGTTAAGTCA	
EsSOS1-F	CTTGTCTGAACGAGCGATGCA	Análisis de la expresión de <i>EsSOS1</i> en las líneas RNAi silenciadas
EsSOS1-R	TTGCCATTGAGCCTTCCGAT	
EsUBQ10-F	CCATTGACAACGTCAAGGCC	
EsUBQ10-R	CACCACGAAGACGGAGAACC	
EsSOS1-1F	GGCTGGGGCTTCTGGTGT	Comprobación secuencia CDS completa de <i>EsSOS1</i> tras los subclonajes
EsSOS1-2F	TTACTGGGAGATGCTTGATG	
EsSOS1-3F	GTTAAGTGAAAAGCAAAGG	
EsSOS1-4F	CACGACAAGCAGCACGATAC	
YPG5	CGTAGTTTTTCAAGTTCTTAG	Comprobación <i>At</i> SOS1
YPG3	TTCCTTCTTCAACCCACCAAA	

2.4 Estudios fisiológicos en bacterias y levaduras

2.4.1 Ensayos de complementación en bacteria y levadura

2.4.1.1 Ensayos de complementación en bacteria y levadura mediante el test de la gota

La caracterización funcional de los transportadores se realizó mediante la expresión heteróloga en mutantes de bacteria o de levadura estudiando la capacidad de complementación del crecimiento defectivo de dichos mutantes. Para los ensayos de complementación en mutantes bacterianos defectivos en el transporte de K^+ se utilizó el ya mencionado medio mínimo MM (ver apartado 2.2.1) suplementado con distintas concentraciones de K^+ y de arabinosa con el fin de regular el nivel de expresión de los transportadores ensayados (solo se muestran resultados con 10 μ M arabinosa). A partir de cultivos frescos de cada cepa, se realizaron suspensiones celulares suspendiendo en 200 μ L de H_2O estéril una muestra de células con ayuda de un palillo de madera estéril. A partir de dicha suspensión, se hicieron tres diluciones seriadas 1:10. De cada dilución, se sembraron aproximadamente 5 μ L con un sembrador físico (erizo). Las placas se incubaron una noche a 37°C.

Los ensayos de complementación en levaduras tanto en cepas defectivas en el transporte de K^+ como de Na^+ se hicieron en medio sólido de PA (que carece de K^+ , Na^+ , y NH_4^+) suplementado con las concentraciones de K^+ y/o Na^+ indicadas en cada caso. La preparación de la suspensión celular inicial, las diluciones seriadas, y la siembra se hicieron de modo similar al caso de análisis de complementación en bacterias. Las placas se incubaron durante 3 o 4 días a 28°C.

2.4.1.2 Ensayos de complementación en levadura mediante curvas de crecimiento

Algunas situaciones han requerido la observación de la respuesta de los transformantes a distintas concentraciones de cationes Na^+ y K^+ en diferentes pHs. En tales situaciones, optamos por estudiar las curvas de crecimiento de la cepa en medios líquidos utilizando un lector Microbiology Reader Bioscreen C Workstation (Growth curves Oy, Finland). De este modo, se pudo seguir el crecimiento de 200 microcultivos (suspensiones de 300 μ L) al mismo tiempo. En estos ensayos, la densidad óptica (DO) de partida de cada uno

de los microcultivos se ajustó a 0,1. Se empleó medio de cultivo PA suplementado con las concentraciones de K^+ y Na^+ descritas en cada ensayo.

2.4.2 Ensayos de flujos de cationes

Para analizar la capacidad de transporte de Rb^+ de *EsSOS1*, expresamos de forma heteróloga dicho sistema junto con los componentes principales de la ruta de activación de SOS1 (SOS2 y SOS3), en paralelo con su correspondiente control (los plásmidos pYPGE15 vacío más pFL32T que contiene *AtSOS2* y *AtSOS3*) en dos cepas distintas de levadura, AXT3K y MA5, y analizamos el efecto de dicha expresión sobre la entrada de Rb^+ en la célula. La determinación de la entrada de Rb^+ se realizó de la siguiente manera: los cultivos se incubaron en 100 ml de PA suplementado con 10 mM KCl más 20 mM NaCl para los transformantes en MA5 y 3 mM KCl más 20 mM NaCl para los transformantes en AXT3K, durante la noche en agitación a 28 °C. Cuando los cultivos alcanzaban una densidad óptica a 550 nm de 0.2-0.3, se recogieron las células por centrifugación (5000 rpm en centrífuga Labofuge Ae Heraeus Sepatech (Hanau, Germany) se lavaron con H_2O libre de Na^+ y K^+ , y se resuspendieron en medio PA pH 6.5 sin K^+ y suplementado con las concentraciones de Rb^+ y Na^+ especificadas en cada caso. A distintos tiempos se tomaron muestras del cultivo (típicamente alternando 5 y 10 ml), que se filtraban a través de filtros Millipore AAWP (Molsheim, France) de 0.8 μm de poro con ayuda de una bomba de vacío. Las células que quedaban retenidas en el filtro, se lavaban con una solución de 20 mM $MgCl_2$ para eliminar cationes adheridos al filtro o a las paredes celulares. La extracción del contenido catiónico celular se realizó con una solución 0,2 M HCl + 10 mM $MgCl_2$ durante la noche. Posteriormente se medía la concentración del catión alcalino en las muestras por espectrometría de emisión con ayuda de un espectrofotómetro de absorción atómica mod. 2380 Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA).

2.5 Estudios fisiológicos en plantas

2.5.1 Experimentos de distribución y acumulación de Na⁺

Para los ensayos de acumulación de Na⁺ a una o dos semanas el protocolo que se siguió fue el siguiente: plantas crecidas durante dos semanas en el medio de crecimiento hidropónico descrito en el apartado 2.2.3.2 suplementado con 0,2 mM NaCl, se transfirieron al mismo medio fresco suplementado con las concentraciones de KCl y NaCl que se detallan en cada caso. Después de una y/o dos semanas de crecimiento en el medio de ensayo, se recogían las muestras de raíz y roseta en plantas de tres semanas de edad (una semana de tratamiento) o muestras de raíz, roseta e inflorescencia en plantas de cuatro semanas de edad (dos semanas de tratamiento).

Antes de proceder a la separación de órganos se lavaron las raíces de las plantas durante 20 min en una solución tampón con 10 mM MES-Ca²⁺ a pH 6,5 y se escurrieron sobre papel de filtro (Whatman® quantitative filter paper, hardened low-ash, Sigma-Aldrich) que no libera cationes Na⁺ o K⁺ contaminantes. En los ensayos que lo requirieron, se determinó el peso fresco de las rosetas durante la toma de muestras. Tras la obtención de las muestras, estas se emplazaban en una estufa a 65° C durante un tiempo no inferior a 48 h para determinar el peso seco de las mismas. Una vez determinado el peso seco se procedía con la extracción de cationes. Los pesos se determinaron en una balanza de precisión modelo AB54-5/FACT (Mettler Toledo).

Figura M1. Detalle de los sistemas de crecimiento Arapponics (foto superior izda) en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad. Detalle del procedimiento de lavado de raíces anterior a la toma de muestras (foto inferior izda). La foto de la derecha ilustra el número mínimo de plantas por ensayo

Para el análisis de contenido de cationes, las muestras de raíces y partes aéreas (roseta más inflorescencia en algunos casos) se digirieron en tubos de polipropileno que contenían 1 M HNO_3 y 10 mM MgCl_2 durante 48 h a temperatura ambiente. Las concentraciones de Na^+ , K^+ y Rb^+ fueron determinadas por espectrometría de emisión atómica y los contenidos en cationes se refirieron al peso seco del tejido vegetal o bien como ratios Na^+/K^+ directamente obtenidos de las concentraciones de los cationes en el extracto de ácido nítrico sin considerar el peso del material vegetal. Cuando se necesitaron diluciones de dicho extracto, estas se hicieron de forma seriada 1:10 con H_2O mq.

2.5.2 Experimentos de entrada de Na^+

Para los ensayos de entrada de Na^+ a 4 h, el protocolo que se siguió fue el siguiente: las plantas se crecieron en un medio carente de Na^+ (con una concentración de Na^+ residual de 2-3 μM), para poder discriminar bien la entrada y acumulación del catión sin un fondo de Na^+ contaminante. A las tres semanas de edad (o cuatro, si se requería determinar el peso seco de las raíces), las plantas se transferían a cubetas con los tratamientos de ensayo correspondientes por un tiempo determinado, normalmente de cuatro horas, tras las cuales se tomaban muestras de raíz y de parte aérea. Los primeros tratamientos de entrada de Na^+ se realizaron suplementando el mismo medio hidropónico de crecimiento con NaCl en las concentraciones indicadas en texto o figuras (e.g. Figura R26). Posteriormente se diseñó un medio de ensayo simplificado a base de un tampón 5 mM MES- Ca^{2+} a pH 6,15 al que se le añadía el Na^+ requerido en forma de MES-NaOH (Se denomina Na/MES), de NaCl, de Na_2SO_4 , o de cualquier otra sal sódica (e.g., Figura R27). Así, un tratamiento de 20 mM MES/Na contiene 5 mM MES- Ca^{2+} a pH 6,15 más 40 mM MES-NaOH a pH 6,15, y un tratamiento, por ejemplo, de 20 mM NaCl contiene 5 mM MES- Ca^{2+} a pH 6,15 más 20 mM NaCl a pH 6,15. De esta manera nuestra solución tiene 0,125 mM Ca^{2+} y 20 mM Na^+ .

Para los ensayos de análisis de la dependencia de nitrato en la entrada de Na^+ (Figura R28), realizados a una concentración de Na^+ constante de 20 mM y a concentraciones variables y crecientes de nitrato desde 0.5 a 20 mM durante 4 h, la concentración de nitrato se obtuvo añadiendo al tampón 5 mM MES- Ca^{2+} pH 6.15 mezclas de Na/MES y NaNO_3 . Para una mejor explicación se muestra la Tabla M5.

Tabla M5. Preparación del medio para los ensayos de dependencia del nitrato en la entrada de Na^+ (Figura R28).

[NaNO_3] mM	Medio Base	[MES-NaOH] mM	Medios Estándares
0	5 mM MES- Ca^{2+}	40	20 mM Na/MES
0.5	5 mM MES- Ca^{2+}	39	
1.5	5 mM MES- Ca^{2+}	37	
5	5 mM MES- Ca^{2+}	30	
20	5 mM MES- Ca^{2+}	0	20 mM NaNO_3

Para los experimentos de entrada de Na^+ variando la concentración externa de Ca^{2+} para obtener 0,125 y 10 mM Ca^{2+} en el medio de ensayo, se substituyó el tampón base de 5 mM MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ por 0,5 mM MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y por 40 mM MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ respectivamente y de esta manera obtener la concentración de Ca^{2+} indicada. Estas soluciones fueron suplementadas con la concentración de Na^+ requerida en forma de Na/MES o NaNO_3 .

Los tratamientos estándares para los ensayos de entrada de Na^+ se hicieron en una solución de tampón 5 mM MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH 6,15 suplementada con las correspondientes sales de Na^+ en forma de 40 mM MES- NaOH , pH 6,15 (Se denomina 20 mM Na/MES) o en forma de 20 mM NaNO_3 .

Por último, los tratamientos destinados a extracción de RNA de raíz y análisis de contenidos de Na^+ , se realizaron con tres medios distintos: medio denominado control, a base de 5 mM MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH 6.15 y los dos tratamiendos estándares descritos para los ensayos de entrada, 20 mM Na/MES y 20 mM NaNO_3 .

Para todos los ensayos, tras 4 h de incubación en las distintas condiciones, (se especifica en el texto o figuras tiempos diferentes para algunos experimentos), se recogían las muestras de raíz y parte aérea tal y como se describe en M.5.2 con la salvedad de que, aunque hubiese tallo floral este no se escindía de la roseta ya que nuestro interés en estos ensayos estaba en el Na^+ que entraba a la raíz y pasaba al xilema. Por último, se determinó el contenido en cationes (ver sección 2.5.1).

En el caso de los experimentos de entrada de Na^+ dirigidos al estudio transcriptómico por RNA-seq, se puso especial cuidado en que las muestras de raíces se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantenían en el congelador a -80°C para evitar cualquier problema de degradación del RNA.

2.5.3 Experimentos de ajuste osmótico

2.5.3.1 *Determinación del ajuste osmótico en presencia de sorbitol*

Semillas de las accesiones Col-0 y Ts-1 esterilizadas se sembraron en cubetas para cultivo estéril ECO2boxes de (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, The Netherlands) que

contenían 180 ml de medio nutritivo para crecimiento hidropónico (ver Materiales y Métodos sección 2.2.3.2) suplementado con K^+ , Na^+ y sorbitol de tres formas distintas: suplemento de 1 mM KCl más 0,2 mM NaCl (control); suplemento de 10 mM KCl más 50 mM (10-50) ó suplemento de 1 mM KCl más 0,2 mM NaCl más 120 mM sorbitol (1-0,2-120). El pH se ajustó a 5.7 con $Ca(OH)_2$, se adicionó 0,4% agarosa y se esterilizó en autoclave. Las cubetas estériles sembradas, se estratificaron a 4° C y oscuridad durante 48 h, tras lo cual se emplazaron en una cámara de germinación para cultivo *in vitro* con 16/8 h luz/oscuridad y 21 °C. Transcurridas dos semanas de crecimiento, se registró el peso fresco de grupos de 5/7 rosetas, y el peso seco después del secado de las muestras en una estufa a 65 °C durante 48 h. A continuación, las muestras se digirieron en la solución de nítrico para la determinación del contenido de cationes (ver Materiales y Métodos sección 2.5.1).

2.5.3.2 Ajuste osmótico en alta salinidad

Las plantas destinadas a estos ensayos se crecieron durante tres o cinco semanas tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.3.4 y sin suplementar con NaCl. Transcurrido ese tiempo, se transfirieron a cubetas Araponics (12 plantas por cubeta) o a tubos Falcon de 50 ml (una planta por tubo) que contenían 5 mM MES- $Ca(OH)_2$ pH 6,15 suplementado con las sales o los compuestos descritos en la Tabla 7 y, ajustado a una osmolalidad de 400 ($\pm$ 2%) mOsm. La osmolalidad se midió con un Micro Osmómetro modelo 300 (Advanced Instruments Inc., Norwood, Massachusetts, USA). Los experimentos con plantas en tubos individuales se utilizaron para un registro fotográfico, donde se tomaron fotos cada 5 min durante las 24 h del ensayo que se montaron posteriormente como una película (película 1, plantas de tres semanas de edad y película 2, plantas de 5 semanas de edad) Se pudo observar el marchitamiento en forma de movimiento de caída y curvatura de las hojas (Tazuke and Kinoshita, 2013). Para estos ensayos se utilizaron plantas Ts-1, Col-0, C24 y el mutante *hkt1-4*, mostrando todas respuestas casi idénticas. No obstante, un número mayor de ensayos se realizaron con la accesión Ts-1, ya que en esta accesión el peciolo más alargado y la posición de las hojas permitió visualizar mejor el efecto del marchitamiento. Los experimentos con plantas de tres semanas de edad en cubetas, se utilizaron para determinar la pérdida de agua de las plantas a las 6 horas del comienzo del ensayo en todas las accesiones y a las 24 horas de ensayo en Ts-1. La pérdida de agua se ha expresado como porcentaje del contenido total de agua normalizado

por el peso seco de la parte aérea. Para el registro de pérdida de agua a 6 h del comienzo del ensayo no tuvimos en cuenta el peso de las sales acumuladas en la parte aérea (<3% PS). Sin embargo, en los ensayos a 24 h, el peso de las sales acumuladas fue significativo ($\approx 15\%$ PS) y se consideró para calcular la pérdida de agua en plantas expuestas a 200 mM NaCl.

2.5.4 Análisis de contenido en antocianinas y clorofila

Tejido procedente de las hojas de las plantas *gl1*, *sos1-1* y *hkt1-4* crecidas en las distintas condiciones experimentales (0,2 mM NaCl o control, 5 mM NaCl y 16 mM NaCl) se pulverizó con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido procesándose inmediatamente o manteniéndose a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Para el análisis del contenido en Antocianinas, aproximadamente 100 mg de tejido pulverizado se resuspendieron en 0,6 ml de 1 % HCl en etanol, se mezcló con ayuda de un agitador vorticial y se incubó a 4°C durante 2 h. Transcurrido ese tiempo se centrifugó dos veces a 12000 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante a 530 nm. El valor control representado en la Figura R15A, es el valor medio de los contenidos de antocianinas obtenidos para plantas *gl-1* a 0,2, 5 y 16 mM NaCl; *sos1-1* a 0,2 mM NaCl y *hkt1-4* a 0,2 mM NaCl. Los contenidos en antocianinas se han expresado como $A_{530} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$ (Ronchi et al. 1997).

Para el análisis del contenido en Clorofila total (clorofila a más clorofila b), aproximadamente 100 mg de tejido pulverizado se resuspendieron en 0,25 ml de acetona al 80%, se mezcló con ayuda de un agitador vorticial durante 1 min, y se centrifugó durante 5 min a 12.000 rpm. A partir del sobrenadante se preparó una dilución 1:20 en acetona al 80% y posteriormente se midió la absorbancia. a 647 y 664 nm. El control representado en la Figura R15B, es el valor medio de los contenidos totales de clorofilas (clorofila a más clorofila b), obtenidos para plantas *gl-1* incubadas en presencia de 5 y 16 mM NaCl. Los contenidos en clorofila total se determinaron según la fórmula:

Clorofila total: $C_t = 17.95 \times A_{647} + 7.9 \times A_{664} \text{ (}\mu\text{g/g PF)}$ (Inskeep and Bloom 1985).

2.6. Análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva por RNA-seq

Para el análisis transcriptómico por RNA Seq, la preparación de las genotecas, la secuenciación y el análisis bioinformático posterior fueron realizados por el equipo técnico del Beijing Genome Institute-BGI (China), utilizando una plataforma Illumina HiSeq™ 2000. Para los análisis de expresión génica se generaron, una media de 24 millones de lecturas limpias (clean reads) de 50 pares de base (pb) de longitud por muestra. Las lecturas obtenidas se alinearon al genoma de referencia de Arabidopsis utilizando las herramientas HISAT (Kim et al., 2015) y Bowtie2 (Langmead et al. 2009), obteniendo una media del 95% de lecturas alineadas. Los niveles de expresión génica se cuantificaron utilizando un paquete de software denominado RSEM (Li and Dewey, 2011) y el método Fragments Per Kilobase per Million reads (FPKM). Los genes con expresión desregulada en las distintas muestras fueron identificados utilizando el método NOISeq (Tarazona et al., 2011), estableciendo un umbral de expresión de ± 2 y una probabilidad de divergencia (diverge probability) ≥ 0.8 . como valores límites para considerar que un gen está expresado diferencialmente. Una vez obtenido del BGI el análisis informático con los archivos que contenían los genes diferencialmente expresados en cada una de las comparativas entre tratamientos, nosotros realizamos los siguientes análisis: de términos de ontología de genes, de agrupamientos de genes expresados diferencialmente (GEDs) en diagramas de Venn, los agrupamientos jerárquicos y la búsqueda de sistemas de transporte utilizando las herramientas informáticas que se describen en las siguientes secciones.

Como control de expresión génica, se han tomado las lecturas de FPKM de unos genes representativos de expresión constitutiva (Tabla M6) utilizados en un estudio transcriptómico anterior (Kreps et al., 2002)

Tabla M6. Genes de control de la expresión transcripcional. Se muestran los valores de FPKMs para cada uno de los replicados de los distintos tratamientos.

AGI	Símbolo	Descripción	Control			Na/MES			NaNO ₃		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
AT1G19910	AVA-P2	ATPase, F0/V0 complex, subunit C	101,5	113,3	112,2	126,9	109,9	114,9	115,4	83,3	80,0
AT3G12380		actin-related protein 5	8,1	7,1	8,5	7,8	8,7	8,0	7,5	9,1	8,4
AT2G09990	-	Ribosomal protein S5 domain 2-type	34,6	35,7	37,1	36,5	38,2	40,3	33,7	34,7	33,0
AT2G18960	AHA1	H ⁺ -ATPase 1	314,1	334,9	301,4	298,9	327,6	294,9	285,5	311,6	298,6
AT2G45960	PIP1B	plasma membrane intrinsic protein 1B	351,7	408,4	431,1	289,3	282,0	268,1	348,8	301,5	294,5
AT3G13920	EIF4A1	eukaryotic translation initiation factor 4A1	204,1	219,2	219,1	232,6	238,9	259,1	235,3	211,3	217,8
AT3G18780	ACT2	actin 2	359,2	333,5	374,1	349,4	342,1	358,6	379,4	351,1	383,5
AT4G05320	UBQ10	polyubiquitin 10	1588,3	1961,4	1745,8	1528,8	1500,4	1463,6	1644,7	1563,7	1571,1
AT4G23650	CDPK6	calcium-dependent protein kinase 6	128,3	127,2	132,2	126,2	131,1	136,7	118,0	124,9	124,2
AT5G37780	CAM1	calmodulin 1	326,8	309,2	299,4	267,9	283,7	287,9	275,1	298,7	298,2
AT5G44340	TUB4	tubulin beta chain 4	157,7	148,3	161,6	150,6	154,8	165,6	142,1	129,6	138,8

2.6.1 Análisis de términos de ontología de genes

Los análisis de ontología génica de los GEDs en las diferentes comparativas entre condiciones, se realizaron utilizando la herramienta **PANTHER** (Mi et al., 2017), versión 13.1 (<http://www.pantherdb.org/>) y la categoría “Slim Biological process”. Los términos de ontología génica enriquecidos significativamente ($p < 0.05$) se calcularon utilizando un análisis de sobre-representación estadística mediante un test de Fisher. Se consideró un p ajustado o False Discovery Rate (FDR).

2.6.2 Agrupamientos jerárquicos de expresión diferencial

Se utilizaron los programas **Cluster 3.0** y **Tree view 1.1.6r4**, para agrupar y mostrar genes con perfiles de expresión similares. En este sentido nos fijamos más en los patrones de expresión que en la magnitud de los cambios de expresión individuales, identificando grupos con expresión similar en las diferentes comparativas entre tratamientos (Figura R44).

2.7 Análisis estadísticos

Los ensayos se han realizado por triplicado aunque se representa un ensayo característico. Para los ensayos de plantas de *Arabidopsis* y *Eutrema* se han utilizado entre 6 y 12 plantas por condición, siendo 8 plantas el número habitual utilizado en la mayor parte de los ensayos. En figuras y tablas se representa el valor de la media y la desviación estándar (SD). Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa **Prism 6** (GraphPad Software Inc., EE.UU.). Para las comparaciones entre dos grupos se realizó una prueba de t de Student. Para las comparaciones entre grupos múltiples se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, dependiendo de si se consideraron una o dos variables, respectivamente. Los análisis estadísticos de los estudios transcriptómicos se describen con detalle en las secciones correspondientes del apartado 2.6.

2.8 Herramientas bioinformáticas

Para el diseño de estrategias de subclonaje y el análisis de patrones de restricción se utilizó el programa **pDRAW32 1.1.133** (AcaClone software). El análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos y la verificación del diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa **Geneious R10** (Biomatters Ltd., NZ). El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante los programas **Oligo Explorer 1.5** y **Oligo Analyser 1.5**, ambos de Gene Link Inc. Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron utilizando la herramienta **ClustalW** disponible en (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) del European Bioinformatics Institute. La búsqueda de secuencias por homología se realizó utilizando la herramienta **BLAST** del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Los diagramas de Venn que indican solapamiento de GEDs generales y GEDs que determinan sistemas de transporte, se realizaron con la herramienta **VENNY 2.1** ([http:// bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/](http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)).

2.9 Verificación molecular y fisiológica del silenciamiento en las líneas de *EsSOS1*

Las líneas transgénicas de *Eutrema* con expresión del gen *SOS1* silenciada (IR-*EsSOS1*), fueron generadas por el laboratorio de la Dra. Karen Schumaker en la Universidad de Arizona. La verificación del silenciamiento se realizó por la doctoranda Rocío Álvarez Aragón para su Proyecto fin de Master realizado en Julio 2013. A continuación, se detalla brevemente el tipo de construcción realizada para conseguir el silenciamiento del gen, así como la posterior validación de las líneas por PCR cuantitativa.

Estas líneas portaban una inserción de T-DNA que consistía en dos repeticiones invertidas de un fragmento del cDNA de *EsSOS1*, separadas por un fragmento espaciador del gen de la β -glucuronidasa (Figura M2A). El transcrito resultante forma una estructura en horquilla con regiones de RNA de doble cadena que promueve la formación de RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) que silencian la expresión de *EsSOS1*.

Se investigó la respuesta al NaCl de la línea silvestre de *Eutrema* y de líneas transgénicas silenciadas en la expresión de *EsSOS1*. Para analizar la tolerancia a NaCl de las líneas transgénicas IR-*EsSOS1*, se seleccionaron las dos líneas transgénicas con los fenotipos

de mayor sensibilidad al Na^+ (#4-2-3 y #5-10-1). Con estas dos líneas y la línea silvestre analizamos la respuesta a 100 mM NaCl en placa y la expresión de *EsSOS1* por PCR cuantitativa (Figura M2C).

Para el crecimiento de *EsSOS1* en placa vertical, las semillas esterilizadas de la línea silvestre *EsSOS1* e IR-*EsSOS1*, se sembraron en placas cuadradas con medio sólido al 0,8% de agar, que contenían 0,5% sacarosa y medio nutritivo TBM (de Thellungiella Basal Media) formado por 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1,5 mM MgSO_4 , 1,25 mM KH_2PO_4 y los siguientes micronutrientes: 100 μM H_3BO_3 , 0,1 μM CoCl_2 , 0,1 μM CuSO_4 , 100 μM FeSO_4 , 100 μM MnSO_4 , 5 μM KI, 1 μM Na_2MoO_4 , 30 μM ZnSO_4 , y 100 μM Na_2EDTA . Las placas sembradas se estratificaron durante 3 días a 4° C tras lo cual se situaron en posición vertical en una cámara de crecimiento bajo un ciclo de 16/8 h luz/oscuridad a 21° C. Las plántulas de 7 días se transfirieron a placas cuadradas con el mismo medio (control) o con el medio suplementado con 100 mM NaCl y se crecieron durante una semana en las mismas condiciones. Las plantas se fotografiaron al final del ensayo (Figura M2B).

Para la extracción de RNA de *Eutrema* y cuantificación de la expresión de *SOS1* en la línea silvestre y silenciadas, se tomaron muestras en nitrógeno líquido de rosetas de plantas de *EsSOS1* e IR-*EsSOS1* de 4 semanas de edad crecidas en medio hidropónico sin Na^+ . El tejido se pulverizó con ayuda de un mortero y se extrajo RNA total utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Thermofisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar el DNA genómico, el RNA se trató con DNasa I (Roche) durante 15 minutos a 37°C. La cuantificación del RNA se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 200 (Thermo Scientific) y la integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel al 1% de agarosa. Se utilizó 0.4 μg de RNA para sintetizar cDNA con el kit iScript® cDNA Synthesis (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, este cDNA se utilizó como molde para su amplificación con el kit SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) en un termociclador iQ2 (Bio-Rad). Los niveles de expresión de *EsSOS1* se analizaron por PCR cuantitativa utilizando los oligonucleótidos que aparecen en la tabla 4. Los valores de expresión relativa se calcularon mediante el método $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando el gen *EsUBQ10* como referencia. La cuantificación se realizó por triplicado con tres réplicas biológicas independientes.

Estos estudios indicaron que el crecimiento a 100 mM NaCl de las líneas silenciadas se inhibió notablemente en ambas líneas, y la expresión original de *EsSOS1* se redujo a un 20% y 40% de la expresión silvestre para la línea #4 y #5 respectivamente. Para nuestro estudio con *Eutrema* elegimos la línea con mayor silenciamiento (línea #5).

Figura M2. Silenciamiento del gen *SOS1* en *Eutrema salsugineum* usando RNAi.

A, Representación gráfica de la construcción de T-DNA utilizada para silenciar la expresión de *SOS1*. B, Selección de la líneas transgénica de mayor sensibilidad al Na⁺. C, Análisis de la expresión génica en la línea silvestre y en las líneas transgénicas silenciadas. ^aFigura procedente de la memoria del trabajo fin de Master (en Biotecnología Agroforestal), realizado por la doctoranda en Julio 2013.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Crecimiento y acumulación de Na^+ en plantas de *Arabidopsis* en medio hidropónico.

3.1.1 Puesta a punto del sistema experimental

El primer problema que se planteó al inicio de esta tesis fue definir un procedimiento para medir el crecimiento de las plantas, tomar muestras y caracterizar respuestas, que se adaptara a los objetivos de la tesis: determinar la tolerancia de *Arabidopsis* a concentraciones de NaCl que inhibieran el crecimiento pero permitieran a las plantas terminar su ciclo vegetativo. No se planteaba hacer innovaciones radicales sobre los procedimientos existentes, pero sí ajustar las técnicas habituales a los objetivos de la tesis, que, necesariamente, se tenían que basar en procedimientos destructivos.

Para estos fines, adoptamos una técnica de crecimiento de plantas en medio hidropónico porque este es un sistema que asegura el aporte de nutrientes inmediato, regular, uniforme y perfectamente cuantificado. Además, se necesitaba un sistema de crecimiento donde la transpiración estuviera controlada, ya que esta afecta al ajuste osmótico y a la toma de iones por parte de la raíz. De igual manera, la utilización del sistema hidropónico garantizaba que la toma y el procesamiento de muestras de los diferentes tejidos de la planta, en particular de la raíz, se realizara de forma sencilla, limpia y evitando contaminaciones de Na^+ y K^+ .

El principal inconveniente asociado a esta técnica de cultivo era que un descenso exagerado en la concentración de O_2 del medio nutritivo, podría conducir a una situación de hipoxia o incluso anoxia que afectaría negativamente a toda la fisiología de la planta. Para la densidad y tamaño de las plantas que decidimos usar, solventamos esta situación mediante un cambio de medio nutritivo, bien agitado, cada 7 días. Además, este frecuente recambio de nutrientes bien aireado, aseguraba el suministro de macro y micronutrientes minimizando tanto la acidificación del medio como el crecimiento excesivo de microorganismos.

Para soporte de las plantas y contener el medio utilizamos el sistema Araponics (Materiales y Métodos, sección 2.2.3.2), el cual permitía un crecimiento óptimo de las plantas y facilitaba el procesamiento de muestras, tanto de parte aérea como de raíces, para la adecuada determinación del contenido de cationes por espectrometría de emisión atómica (Materiales y Métodos, sección 2.5.1).

Por otro lado, había que reducir todo lo posible el contenido en Na^+ , ya que uno de nuestros objetivos era la evaluación de la entrada y la distribución del Na^+ en tiempos cortos y para ello hacían falta plantas con un contenido inicial de Na^+ muy bajo. Después de varios ensayos, diseñamos una combinación de nutrientes en medio líquido que contenía tan sólo una concentración de Na^+ residual de entre 2 y 3 μM (Materiales y Métodos, sección 2.3.3).

Otro detalle era el soporte para la germinación de las semillas, ya que, debía proporcionar un buen soporte sin exponer a la raíz a una concentración de Na^+ que pudiera transportarse. Ensayamos lana de vidrio, agar y agarosa, y elegimos agarosa por ser la que menos contenido en Na^+ tenía. Para reducir aún más este contenido, la agarosa se lavaba en agua mili-Q suplementada con 5 mM KCl y 5 mM MgCl durante 2 h, con el fin de intercambiar Na^+ por los cationes K^+ y Mg^{2+} . Seguidamente se hacían tres lavados sucesivos con H_2O miliq que eliminaban las sales presentes en el agua tras el intercambio iónico. Con este procedimiento logramos reducir el contenido en Na^+ de la agarosa desde 33,2 μM hasta 6,5 μM .

El siguiente paso fue diseñar el lavado de las raíces con el objetivo de eliminar los restos de medio (Na^+ y K^+) que pudieran quedar retenidos en el exterior y zonas apoplásticas del tejido radicular. Para este fin, se utilizaron lavados con MES- Ca^{2+} a 10 mM y pH 6.5. Se ensayaron distintos tiempos para asegurarnos un buen lavado minimizando las pérdidas de contenido intracelular. Después de numerosos ensayos, elegimos 20 minutos como tiempo estándar de lavado de las raíces.

En todos los ensayos la parte aérea y raíz se separaban. Además, en el caso de plantas de más de tres semanas, en las que ya empieza a aparecer el tallo floral, en muchos de los ensayos, también se separaba la roseta del tallo floral. Para estas operaciones, se ensayó: transferir toda la planta al medio de lavado de raíces y a los 20 minutos separar raíz y

parte aérea o cortar la parte aérea primero y después transferir el soporte (“seed holder”) con la raíz al medio de lavado. Esto lo hicimos para asegurarnos, por un lado, que no se producía un intercambio significativo de cationes entre raíz y parte aérea durante los 20 minutos de lavado de las raíces en el tampón de lavado y por otro que no se producía pérdida apreciable del contenido interno de cationes al producir el corte entre raíz y roseta durante los 20 minutos de lavado de raíces. Finalmente, decidimos estandarizar los ensayos lavando las raíces durante 20 minutos y separando después los distintos órganos de la planta.

Por último, para los experimentos de tolerancia al Na^+ , probamos a suministrar la concentración de Na^+ a ensayar desde la siembra de la semilla o a plantas que habían crecido dos semanas sin Na^+ o en una concentración de Na^+ baja, de 200 μM . Concluimos que germinar y crecer las plantas en las concentraciones de Na^+ del ensayo durante 4 semanas aumentaba mucho la variabilidad del peso de las plantas de un mismo ensayo, además de reducir considerablemente el peso de las raíces hasta valores que impedían una correcta determinación.

3.1.2 Contenido basal de Na^+ en el medio

La primera consideración para nuestra aproximación experimental era que en cultivos hidropónicos el crecimiento de *Arabidopsis* se podía estimular con Na^+ . Y así lo observamos en resultados preliminares con 5-10 mM de Na^+ a 1mM K^+ . Estas concentraciones, sin embargo, eran muy altas para nuestros ensayos utilizando plantas *hkt1* y *sos1*. Por ello, después de varios ensayos comparativos con plantas mutantes y silvestres decidimos utilizar 0,2 mM de Na^+ en los cultivos de crecimiento, dejando los medios sin Na^+ para los experimentos de transporte.

Un problema adicional eran las paradas y retrasos transitorios que siguen a una exposición a NaCl (Munns, 1993). Estos efectos transitorios, que pueden llevar a conclusiones erróneas si no se tienen en cuenta, quizás no sean relevantes en muchos casos (e.g., Labidi et al., 2002; Jha et al., 2010), pero nosotros quisimos evitarlos. Por ello, estandarizamos los ensayos creciendo las plantas a 200 μM Na^+ (similar a la que tiene el medio Murashige and Skoog a 0,5 X (200 μM) y a las 2 semanas las transferíamos a los medios de ensayo con las concentraciones de Na^+ seleccionadas. En este medio permanecían una semana o

dos semanas adicionales tras las cuales, se realizaba la toma de muestras (plantas de tres y de cuatro semanas de edad respectivamente). Por este procedimiento, el crecimiento se determinaba en la segunda semana de exposición a Na^+ , cuando cualquier respuesta transitoria ya había concluido. Las plantas de tres semanas, tenían botón floral o una inflorescencia muy pequeña en algunas plantas, mientras que las plantas de 4 semanas, tenían una roseta verde bastante crecida, pero sin signos de senescencia y una inflorescencia cuyo tallo primario presentaba flores y algunas silicuas bien desarrolladas y verdes. Todos los experimentos de puesta a punto del procedimiento experimental y lo que hasta ahora se ha descrito se refiere a plantas Col-0. El estudio con otras accesiones siguió el mismo procedimiento salvo que no todas habían florecido para el tiempo de la toma de muestras. En estas accesiones que tenían un tiempo de floración más retrasado, la parte aérea sólo estaba conformada por la roseta. De este modo, un experimento estándar de distribución y tolerancia a la sal en Col-0 sigue el modelo de la Figura R1.

Figura R1. Dibujo que muestra un esquema del procedimiento estándar que se ha seguido en los estudios de la respuesta de Arabidopsis a la salinidad

3.1.3 Expresión del contenido en Na^+

A la hora de expresar el contenido en Na^+ de los órganos de la planta en casi todos nuestros ensayos hemos utilizado la ratio molar Na^+/K^+ . Asumiendo que el Na^+ es tóxico

para la planta porque compite con el K^+ en algunas de sus funciones, la ratio molar Na^+/K^+ interna puede servir como una referencia para la toxicidad del Na^+ . Utilizar esta ratio presenta dos ventajas con respecto a utilizar el contenido en Na^+ referido al peso seco. Por un lado, considera el contenido de K^+ de dichos órganos (que no sería tenido en cuenta en el otro caso) y por otro, permite determinar el contenido en Na^+ cuando el peso de la raíz es muy pequeño y no puede medirse con exactitud. Sin embargo, en los ensayos que lo permitieron, que fueron la mayoría, también se determinó el contenido en Na^+ referido a peso seco.

Dada la variabilidad inter-ensayo en peso y tamaño que se produce al crecer las plantas, quisimos asegurarnos de que el K^+ era un buen marcador del peso de la raíz. Para ello se efectuaron numerosos ensayos donde se estudió la correlación entre el contenido de K^+ de la raíz y el peso seco de la misma en plantas tratadas con 10 y 20 mM NaCl y en plantas sin tratar. Como se puede comprobar en la Figura 2A, existe una alta correlación lineal entre el K^+ de la raíz y el peso seco de la misma, manteniéndose esa correlación incluso en los tratamientos con Na^+ . En la parte aérea la situación es más complicada porque, como veremos más adelante, el Na^+ se acumula a concentraciones altas. No obstante, si sumamos los contenidos de K^+ y Na^+ la correlación con el peso seco es buena (Figura 2B).

Figura R2. A, Correlación entre contenido interno de K^+ (nmol) y el peso seco (mg) de raíces de plantas Col-0 de cuatro semanas de edad tras dos semanas de crecimiento en 0, 10 y 20 mM NaCl. B, Correlación entre contenido interno de Na^+ más K^+ (nmol) y el peso seco (mg) de partes aéreas (roseta más inflorescencia) de plantas Col-0 de cuatro semanas de edad tras dos semanas de crecimiento en 0, 10 y 20 mM NaCl. Se muestra el coeficiente de correlación de Pearson, (Pearson r). En ambos casos $p < 0.0001$.

R.2 Análisis funcional y genético de la acumulación de Na⁺ en Arabidopsis.

3.2.1 Caracterización fisiológica de la acumulación de Na⁺ durante el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

3.2.1.1 Crecimiento de plantas de Arabidopsis Col-0 y Ts-1

Una vez desarrollada la metodología experimental se estudió la respuesta de Arabidopsis al NaCl. El primer objetivo era ratificar el rango de concentraciones de NaCl en las que Arabidopsis inhibe el crecimiento pero no sufre una muerte rápida debida a la disminución del potencial hídrico en el medio. Con este propósito, en principio, se utilizaron plantas Col-0, pero posteriormente se utilizaron plantas Ts-1 a fin de ampliar la observación con plantas de una accesión que se supone que es más tolerante a NaCl (Rus et al., 2006).

Siguiendo el esquema de la Figura R1, la Figura R3 panel A y la Tabla R1 presentan el peso seco de las rosetas de plantas Col-0 de tres semanas de edad, tratadas durante una semana a concentraciones crecientes de NaCl desde 0,2 a 80 mM, el peso de la raíz no se puede determinar con precisión. En estas plantas se observaron diferencias significativas en el crecimiento, algo menos significativas que cuando el tratamiento se prolongó una semana más, descrito a continuación. Las Figuras R3 paneles B y C y la Tabla R1 presentan el peso seco de plantas Col-0 de cuatro semanas de edad tratadas dos semanas con concentraciones crecientes de NaCl desde 0,2 a 80 mM. A 20 mM NaCl, el peso seco no se redujo respecto a las plantas control (0,2 mM NaCl), ni en la raíz ni en la parte aérea. A 40 mM NaCl, se produjo una disminución significativa en el crecimiento tanto en la raíz como en la parte aérea. A 60 y 80 mM NaCl el peso seco de la parte aérea se redujo a la mitad y a un tercio respectivamente en comparación con el control. En estas concentraciones, las raíces seguían el mismo patrón de reducción de peso seco que las partes aéreas, aunque no se pudo cuantificar con precisión el peso de las raíces en los tratamientos a 80 mM NaCl por su reducido tamaño. Las respuestas descritas coinciden con las referidas en diferentes trabajos utilizando plantas Col-0 a 50 mM NaCl (Labidi et al., 2002; Alemán et al., 2009; Kaddour et al., 2009).

Figura R3. A, Peso seco de plantas Col-0 de tres semanas de edad y tratadas una semana con concentraciones crecientes de NaCl desde 0,2 a 80 mM en parte aérea. B, Peso seco de plantas Col-0 de cuatro semanas de edad y tratadas dos semanas con concentraciones crecientes de NaCl desde 0,2 a 80 mM en raíz y parte aérea. Se muestra un gráfico de coordenadas donde cada planta corresponde a un punto y se señala la media y la desviación estándar. Letras diferentes indican que las diferencias son estadísticamente significativas. One-way ANOVA y Tukey's HSD test; $p < 0.05$

Como ya se ha dicho, también se ensayaron paralelamente plantas de la accesión tolerante Ts-1 (Rus et al., 2006), que presentan una floración más tardía (Shindo et al., 2005) y las cuales, tras dos semanas en Na^+ carecen de tallo floral (Figura R4; Tabla R1). De esta manera, se estableció el límite de los 20 mM NaCl como la concentración de sodio a la cual el peso seco de la planta no se vio reducido en comparación con las plantas control (Figuras R3 y R4; Tabla R1).

Tabla R1. Peso seco y contenidos en Na^+ y K^+ de plantas Col-0 y Ts-1 de cuatro semanas después de dos semanas en Na^+ a concentraciones crecientes de NaCl hasta 80 mM. Las plantas Ts-1 de cuatro semanas no florecen por lo que no hay datos de la inflorescencia. ^a n.d significa no determinado por su pequeño tamaño.

Línea	$\text{K}^+ - \text{Na}^+$ (mM)	Raíz				Roseta				Inflorescencia			
		PS (mg)	K^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/K^+ (molar ratio)	PS (mg)	K^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/K^+ (molar ratio)	PS (mg)	K^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/K^+ (molar ratio)
Col-0	0,2	6,5±1,9	1574±151	9,8±0,8	< 0,01	23,3±3,1	1371±94	22,3±2,3	0,016±0,02	24,0±4,5	1815±66	14,3±0,7	< 0,01
	20	7,1±0,8	1205±105	467±44	0,39±0,03	23,2±4,0	607±84	740±87	1,3±0,3	27±5	1460±51	275±38	0,19±0,03
	40	4,2±0,8	938±134	1001±114	0,85±0,05	15,4±2,8	307±53	1531±207	5,2±1,4	19,0±4,1	1230±108	615±113	0,51±0,14
	60	2,9±0,4	832±117	1218±182	1,46±0,12	9,1±1,3	203±30	2227±265	11,3±2,6	10,9±1,1	1032±85	812±100	0,79±0,09
	80	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	1,62±0,05	7,3±1,0	215±5	3209±342	14,9±1,7	4,9±1,8	749±80	1162±221	1,5±0,5
Ts-1	0,2	4,6 ± 0,3	1487±232	4,5±1,8	< 0,01	30,9 ± 1,9	1733±137	27,9±2,1	0,016 ± 0,002				
	20	5,5 ± 1,0	1886±173	280±32	0,15 ± 0,01	27,1 ± 4,8	587±38	1844±115	3,1 ± 0,2				
	40	3,4 ± 0,7	1693±124	395±24	0,23 ± 0,01	16,4 ± 3,0	486±30	2828±87	5,8 ± 0,3				
	60	3,1 ± 0,8	1543±142	432±23	0,28 ± 0,04	15,0 ± 2,6	393±33	3446±162	8,8 ± 1,0				
	80	1,9 ± 0,6	1199±97	512±38	0,43 ± 0,03	9,7 ± 2,2	227±16	4318±380	19,2 ± 2,8

3.2.1.2 Contenido en Na^+ de plantas de *Arabidopsis* Col-0 y Ts-1

Al aumentar la concentración externa de NaCl en el rango de concentraciones ensayadas, la ratio molar Na^+/K^+ aumentó en todos los órganos, pero de manera diferente (Tablas R1 y R2). La inflorescencia fue la parte de la planta con menor acumulación de Na^+ ($\text{Na}^+/\text{K}^+ < 1,5$). La raíz también se mantuvo dentro de límites relativamente bajos ($\text{Na}^+/\text{K}^+ < 2$). Las rosetas, en cambio, acumularon ratios Na^+/K^+ muy importantes de Na^+ , especialmente a 80 mM NaCl llegando a valores de 15.

Al comparar los contenidos en Na^+ en las plantas crecidas una semana y dos semanas en NaCl pudimos observar que las raíces mantenían unas ratios molares Na^+/K^+ prácticamente constantes (Figura R5A, Tabla R2). Sin embargo, estas ratios se incrementaban de manera significativa en las rosetas durante la segunda semana de tratamiento, cuando la parte aérea ya presentaba un tallo floral desarrollado (Figura 5B, Tabla 2). Este incremento de la ratio Na^+/K^+ se puede explicar por la retención de Na^+ en

la roseta y la exclusión en la inflorescencia. La Figura 6A resume gráficamente estas observaciones para plantas creciendo a 40 mM NaCl.

Tabla R2. Ratios molares Na^+/K^+ de plantas Col-0 creciendo durante una y dos semanas a concentraciones crecientes de NaCl. Se encuadra en color azul, las ratios compatible con el crecimiento normal de la planta y en color rojo, las ratios asociadas a una inhibición del crecimiento.

NaCl (mM)	Una semana en Na^+		Dos semanas en Na^+		
	Raíz (Na^+/K^+)	Roseta (Na^+/K^+)	Raíz (Na^+/K^+)	Roseta (Na^+/K^+)	Inflorescencia (Na^+/K^+)
0,2	< 0,01	$0,018 \pm 0,004$	< 0,01	< 0,01	< 0,01
20	$0,32 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,03$	$1,3 \pm 0,3$	$0,19 \pm 0,03$
40	$0,78 \pm 0,12$	$1,8 \pm 0,3$	$0,86 \pm 0,05$	$5,2 \pm 1,4$	$0,51 \pm 0,14$
60	$1,3 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$	$1,46 \pm 0,12$	$11,3 \pm 2,6$	$0,79 \pm 0,09$
80	$1,3 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,5$	$1,62 \pm 0,05$	$14,9 \pm 1,7$	$1,5 \pm 0,5$

Figura R5. Evolución temporal de ratios molares Na^+/K^+ de plantas Col-0 expuestas a concentraciones crecientes de NaCl durante una (morado) y dos semanas (ocre). A, ratios Comparación de ratios Na^+/K^+ durante una y dos semanas en raíces. B, Comparación de ratios Na^+/K^+ durante una y dos semanas en rosetas. En verde, se señalan las ratios molares de Col-0 a 20 mM NaCl donde no existe inhibición del crecimiento. Se representan medias y SD de 8 plantas.

A

B

Figura R6. A, Dibujo que muestra la distribución de Na⁺ en plantas de Arabidopsis de tres y cuatro semanas de edad expuestas una y dos semanas a 40 mM NaCl. B, Dibujo que muestra la distribución de Na⁺ en plantas de Arabidopsis de tres semanas de edad expuestas una y dos semanas a 40 mM NaCl. Los contenidos en Na⁺ se expresan en términos de ratio molar Na⁺/K⁺.

La hipótesis de que el incremento de Na^+ en la roseta se debía a su exclusión del tallo floral entraba en contradicción con la idea de que las plantas de *Arabidopsis* acumulan Na^+ en la roseta de forma continua; es decir, las plantas más viejas tienen más Na^+ que las plantas más jóvenes (Essah et al., 2003). Para estudiar si el incremento del contenido en Na^+ en las rosetas de plantas Col-0 durante la segunda semana en NaCl se debía al crecimiento y exclusión de Na^+ de la inflorescencia o a un aumento permanente del Na^+ a medida que la hoja envejecía, se realizó un ensayo donde el Na^+ se agregó una semana antes que en el procedimiento estándar, es decir a plantas de una semana de edad. De esta manera, se tomaron muestras de plantas de tres semanas de edad que no habían florecido aún y que habían crecido dos semanas en 40 mM NaCl. Conforme muestra la Figura R6B, la media de la ratio molar para la roseta fue de $(2,0 \pm 0,4)$ no muy distinta de la obtenida con el procedimiento estándar de 1 semana en Na^+ ($1,8 \pm 0,3$ en Tabla R2). De este modo se corroboró que el incremento en Na^+ de la roseta se debió al crecimiento del tallo floral. La Figura R7 muestra gráficamente y con fotografías la respuesta de Col-0

Figura R7. A, Aspecto de las plantas Col-0 expuestas dos semanas a concentraciones crecientes de NaCl. B, Efecto inhibitorio del NaCl en el crecimiento de la parte aérea de plantas Col-0 expuestas una y dos semanas a concentraciones crecientes de NaCl. Se representan medias y SD de 8 plantas.

En resumen, las plantas de Col-0 crecen normalmente a 20 mM NaCl y los contenidos de Na^+ que se observan a esta concentración pueden considerarse no tóxicos. No obstante, para poder definir qué niveles de Na^+ eran tóxicos para las plantas de Col-0 había que tener en cuenta el aumento del contenido en Na^+ en la roseta producido por la aparición de la inflorescencia. Así fue necesario valorar las ratios molares Na^+/K^+ en plantas de una semana en Na^+ (sin inflorescencia) considerando si su crecimiento estaba o no inhibido una semana más tarde (tras dos semanas en Na^+ con tallo floral crecido). Esto implicó que las ratios Na^+/K^+ internas observadas en raíces y rosetas tras una semana en 20 mM Na^+ , 0,32 y 0,66 respectivamente (Tabla 2), eran compatibles con un desarrollo normal de la planta y por lo tanto se podían catalogar como ratios no tóxicas. Las ratios internas de Na^+/K^+ tras una semana de tratamiento a 40 mM NaCl, 0,78 en la raíz y a 1,8 en la parte aérea (Tabla 2) podrían estar asociadas a la toxicidad del Na^+ . Sin embargo, la inhibición del crecimiento que se observó en las plantas Col-0 a 40 mM NaCl seguía planteando muchas cuestiones, ya que no se podía saber si estaba causada por un efecto iónico del Na^+ , que podía afectar a la raíz o a la parte aérea, o deberse a un efecto osmótico.

Antes de continuar con más ensayos, estudiamos la posibilidad de que la disminución del crecimiento de las plantas Col-0 en NaCl se debiera a la toxicidad del ión cloruro. Para ello, repetimos los ensayos descritos con las mismas concentraciones del ión Na^+ en forma de Na_2SO_4 , obteniendo los mismos resultados que con NaCl, tanto en inhibición del crecimiento (Figura R8A) como en aparición de clorosis en las hojas (Figura R8B).

B

Figura R8. A, Comparación de las ratios molares Na^+/K^+ de raíz y de parte aérea de plantas Col-0 crecidas dos semanas en presencia de concentraciones externas de Na_2SO_4 (cajas rojas) o concentraciones externas de NaCl (cajas azules). Se representan medias y SD de 8 plantas. B, Aspecto de las plantas Col-0 expuestas dos semanas a 20 mM Na_2SO_4 (40 mM Na^+).

3.2.1.3 Toxicidad del Na^+ en *Arabidopsis* a bajo NaCl

Para averiguar si se trataba de un efecto osmótico o tóxico, decidimos determinar cuáles eran los efectos tóxicos del Na^+ sobre la raíz y sobre la parte aérea de plantas de *Arabidopsis* en ausencia de inhibición osmótica (concentraciones de NaCl menores de 20 mM, sin efectos sobre el crecimiento de la planta). Para este propósito, nos fijamos en los dos principales transportadores de Na^+ que están implicados en la distribución del catión en la planta: Salt Overly Sensitive, **SOS1** y High-Affinity K^+ Transporter 1, **HKT1** cuyos alelos mutantes *sos1-1* y *hkt1-4* han sido ampliamente estudiados y están muy bien caracterizados. Estos mutantes no sobreviven o están muy afectados a 20 mM NaCl, que era nuestra concentración inocua.

Las plantas mutantes *hkt1* carecen del transportador situado en las células del parénquima xilemático encargado de la recuperación del Na^+ desde la savia del xilema, de modo que estas plantas acumulan Na^+ en la parte aérea (Berthomieu et al., 2003; Rus et al., 2004; 2006; Sunarpi et al., 2005; Davenport et al., 2007; Gierth and Mäser, 2007). Por otro lado, las plantas mutantes *sos1* son defectuosas sacando Na^+ desde las células de la raíz

hacia el medio externo y también hacia el xilema. Como consecuencia esas plantas acumulan mucho Na^+ en la de raíz (Shi et al., 2002; Qiu et al., 2003; Davenport et al., 2007) (Figura 9).

Figura R9. Dibujo que muestra el efecto de las mutaciones *hkt1* y *sos1* sobre la acumulación de Na^+ en Arabidopsis.

Los alelos mutantes *hkt1-4* y *sos1-1*, se obtuvieron en plantas Col-0 con la mutación *glabra*, *gll*. En nuestras condiciones, esta mutación *glabra* no afectaba a la tolerancia al Na^+ de las plantas Col-0 (Figura 10), pero se sabe que hay respuestas transcriptómica a la sal que difieren entre *GLI* y *gll* (Chan et al., 2013) por lo que todos nuestros experimentos con los alelos mutantes de los transportadores HKT1 y SOS1 se realizaron llevando como control plantas *gll*.

Figura R10. Comparación entre ratios Na^+/K^+ en raíz y parte aérea de plantas Col-0 y *gll* de cuatro semanas de edad y expuestas dos semanas a condiciones control, 10 y 20 mM NaCl. Se representan medias y SD de 8 plantas.

3.2.1.3.1 Toxicidad del Na^+ en la parte aérea de plantas *hkt1-4*

Las plantas *hkt1-4* eran más pequeñas en raíz e inflorescencia que su correspondiente fondo genético *gll*, independientemente de la concentración de NaCl externo. Sin embargo, tras una semana en Na^+ , las plantas *hkt1-4* no mostraron una inhibición significativa de su crecimiento en concentraciones de NaCl inferiores a 10 mM comparado con su propio crecimiento en condiciones control (0,2 mM NaCl) (Tabla R3). Tras dos semanas de exposición al Na^+ , estas plantas mostraron una inhibición en el crecimiento de la roseta de aproximadamente el 25% comparado con el crecimiento a 0,2 mM NaCl (Figura R11; Tabla R4).

Tabla R3. Peso seco, contenidos en Na^+ y K^+ y ratios de Na^+ (Roseta/Raíz), de plantas *gll*, *hkt1-4* y *sos1-1* expuestas **una semana** a diferentes concentraciones de NaCl inocuas para plantas *gll*. Se representan los valores correspondientes a la media $\pm$ la desviación estándar de 8 plantas. ^aCalculado a partir de los ratios molares Na^+/K^+ . Los valores de peso seco de las raíces no pudieron determinarse debido al poco peso de las mismas.

Linea	NaCl (mM)	Raíz	Roseta				^a ratio Na^+ (Roseta/Raíz)
		Na^+/K^+ (ratio molar)	Peso seco (mg)	K^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/K^+ (ratio molar)	
<i>gll</i>	0,2	0,008 $\pm$ 0,001	8,4 $\pm$ 1,3	1139 $\pm$ 115	22 $\pm$ 2	0,020 $\pm$ 0,002	2,5
	2,0	0,025 $\pm$ 0,003	8,1 $\pm$ 0,9	998 $\pm$ 47	78 $\pm$ 12	0,078 $\pm$ 0,012	3,1
	4,0	0,053 $\pm$ 0,001	9,5 $\pm$ 0,7	988 $\pm$ 67	161 $\pm$ 30	0,16 $\pm$ 0,04	3,0
	8,0	0,10 $\pm$ 0,01	8,2 $\pm$ 1,3	894 $\pm$ 81	206 $\pm$ 33	0,23 $\pm$ 0,03	2,3
<i>hkt1-4</i>	0,2	0,005 $\pm$ 0,001	6,6 $\pm$ 1,5	1044 $\pm$ 50	42,5 $\pm$ 1,8	0,041 $\pm$ 0,003	8,2
	4,0	0,014 $\pm$ 0,002	5,8 $\pm$ 0,5	754 $\pm$ 85	725 $\pm$ 37	0,97 $\pm$ 0,09	69
	8,0	0,022 $\pm$ 0,002	5,4 $\pm$ 1,0	593 $\pm$ 51	1174 $\pm$ 53	2,0 $\pm$ 0,2	91
<i>sos1-1</i>	0,2	0,024 $\pm$ 0,002	8,6 $\pm$ 1,1	1169 $\pm$ 88	33 $\pm$ 4	0,028 $\pm$ 0,003	1,1
	2,0	0,17 $\pm$ 0,05	8,0 $\pm$ 0,9	971 $\pm$ 152	207 $\pm$ 11	0,21 $\pm$ 0,02	1,2
	4,0	0,56 $\pm$ 0,04	7,2 $\pm$ 0,8	830 $\pm$ 87	444 $\pm$ 53	0,54 $\pm$ 0,06	1,0

Tabla R4. Peso seco y contenidos en Na^+ y K^+ de plantas *gll*, *hkt1-4* y *sosl-1* expuestas **dos semanas** a diferentes concentraciones de NaCl inocuas para plantas *gll*.^a n.d significa no determinado por su pequeño tamaño.

Linea	NaCl (mM)	Raíz				Roseta				Inflorescencia			
		Peso seco (mg)	K^+/DW (nmol mg^{-1})	Na^+/DW (nmol mg^{-1})	Na^+/K^+ (ratio molar)	Peso seco (mg)	K^+/DW (nmol mg^{-1})	Na^+/DW (nmol mg^{-1})	Na^+/K^+ (ratio molar)	Peso seco (mg)	K^+/DW (nmol mg^{-1})	Na^+/DW (nmol mg^{-1})	Na^+/K^+ (ratio molar)
<i>gll</i>	0,2	6,1±0,6	1276±65	6,4±0,7	0,0050±0,0001	23,2±1,7	1126±79	14,6±0,8	0,013±0,001	21,9±5,9	1483±131	10,2±0,8	0,007±0,001
	2,0	6,4±0,8	1321±128	26±2	0,020±0,002	21,0±2,3	1152±104	73±7	0,064±0,008	25,8±5,3	1882±171	34±2	0,017±0,003
	4,0	6,5±0,8	1182±44	53±6	0,045±0,004	21,7±3,8	1034±60	166±26	0,21±0,05	29,6±6,4	1474±112	54±10	0,04±0,01
	8,0	5,9±0,5	1428±129	144±9	0,10±0,01	22,5±4,5	909±102	214±41	0,33±0,06	20,6±7,4	1639±76	110±13	0,07±0,01
<i>hkt1-4</i>	0,2	4,6±0,6	1468±189	6,7±0,7	0,0046±0,0004	22,0±1,3	1231±127	48±2	0,040±0,005	9,0±3,1	1756±255	23±1	0,014±0,001
	4,0	4,6±0,7	1497±128	25±3	0,017±0,003	23,0±1,9	877±83	1163±69	1,3±0,2	10,7±3,4	1426±127	310±43	0,22±0,02
	8,0	3,5±1,0	1425±126	35±5	0,025±0,003	16,4±3,3	438±87	2087±201	5,0±1,3	8,0±1,6	1282±95	584±76	0,46±0,09
<i>sosl-1</i>	0,2	6,6±0,6	1526±158	61±7	0,040±0,002	26,0±3,0	998±110	19,4±1,4	0,020±0,002	16,4±4,5	1420±198	31±1	0,022±0,003
	2,0	5,9±0,8	1276±96	521±66	0,41±0,02	20,3±2,0	880±140	206±12	0,24±0,04	14,0±5,4	1083±44	189±14	0,17±0,01
	4,0	n.d	n.d ^a	n.d ^a	1,8±0,2	14,6±2,0	553±48	550±32	1,00±0,12	13,4±2,7	872±55	325±16	0,37±0,03

Figura R11. Inhibición en el crecimiento de plantas *hkt1-4*, expuestas dos semanas a concentraciones de NaCl inocuas para las plantas control *gll*. Se representan medias y SD de 8 plantas. Distinta letra indica una diferencia significativa en un test t-student con una $p < 0.05$. Para mayor claridad se usan letras negritas, minúsculas e itálica para cada órgano distinto.

Cuando analizamos el contenido en Na^+ de las plantas *hkt1* crecidas una y dos semanas a concentraciones de Na^+ menores a 10 mM NaCl, pudimos comprobar que tal y como esperábamos, las plantas *hkt1* tenían un mayor contenido en Na^+ en la parte aérea que el control *gll*, incluso en 0,2 mM NaCl. (Tablas R3 y R4). Esto se observa muy claramente si nos fijamos en la ratio Na^+ roseta / Na^+ raíz en plantas de tres semanas crecidas una semana en Na^+ donde sólo hay dos compartimentos, raíz y roseta (Tabla R3). Para el control *gll*, esta ratio varía entre 2 y 3, cuando las plantas crecen entre 0,2 y 8 mM NaCl externo. En el caso de plantas *hkt1-4*, esta ratio oscila entre 8 y 91, es decir, 30 veces superior a la ratio de *gll* a sólo 8 mM Na^+ externo.

Después de una semana de crecimiento a 8 mM NaCl, las raíces del mutante *hkt1-4* alcanzaron una ratio Na^+/K^+ de 0,022 (Figura 12A; Tabla R3), que es mucho menor de 0,32 que era el valor de la ratio que habíamos determinado como compatible con el crecimiento normal de plantas Col-0 a 20 mM NaCl (Figura R5A). Además, a 8 mM de NaCl externo, aunque se aprecia una disminución en el crecimiento de la raíz respecto al control *hkt1-4* a 0,2 mM NaCl, no llega a ser significativa (Figura 11; Tabla R3), por lo

que concluimos que no hay toxicidad de raíz en este mutante. Sin embargo, a 8 mM NaCl, la ratio de Na^+/K^+ en la roseta es 2,0 (Figura 12B; Tabla R3), que excede considerablemente el nivel que habíamos establecido como normal “no tóxico” para Col-0 (0,66) (Figura 5B).

Más aún, se observa una inhibición significativa en el crecimiento de la roseta (Figura 11; Tabla R4). Como en estas concentraciones en las que trabajamos se descarta cualquier tipo de inhibición de carácter osmótico, podemos concluir que la alta ratio Na^+/K^+ (2.0) causa toxicidad en la roseta del mutante *hkt1*.

Figura R12. Relación entre ratios molares Na^+/K^+ y toxicidad por Na^+ en raíz (A) y roseta (B) de plantas *hkt1-4* y *sos1-1* expuestas a concentraciones de NaCl inocuas para las plantas control *gll*. La línea verde señala las ratios determinadas para raíz y roseta como ratios compatibles con el crecimiento normal de plantas Col-0 en 20 mM NaCl. Se representan medias y SD de 8 plantas.

Teniendo en cuenta que las plantas *hkt1-4* a 4 mM NaCl (ratio Na^+/K^+ en roseta de 0,97) no estaban inhibidas, podemos concluir que una ratio Na^+/K^+ de aproximadamente 1,0 en la roseta no es tóxico para Col-0. (Tabla R2). Como ya mencionamos anteriormente, la toxicidad del Na^+ sobre la parte aérea de las plantas se ha asociado con un amarilleamiento de las hojas (Rajendran, Tester, and Roy 2009). Tras dos semanas en Na^+ , las plantas *hkt1-4* en 8 mM NaCl, presentaban las dos o tres primeras hojas afectadas con este signo de amarilleamiento (Figura R13), que, al igual que en las plantas Col-0, parece ser un síntoma de la toxicidad por Na^+ (Rajendran, Tester, and Roy 2009). Las raíces de las plantas *hkt1-4* inhibidas por 8 mM NaCl eran más pequeñas que las correspondientes en

condiciones control a pesar de presentar un muy bajo contenido en Na^+ (Tabla 4R). Esto parece indicar que estas raíces crecen de forma más lenta debido a la inhibición que produce el Na^+ sobre la parte aérea. Y, aunque las inflorescencias pesaban menos que el control *gll* en todas las concentraciones de NaCl ensayadas, incluso con ratios Na^+/K^+ similares a los de *gll*, esto no es una característica asociada al Na^+ sino que sugiere que se debe a un efecto independiente.

Figura R13. Signos de toxicidad por Na^+ en el mutante *hkt1-4* expuesto dos semanas a una concentración de NaCl de 8 mM.

3.2.1.3.2 Toxicidad del Na^+ en la raíz de plantas *sos1-1*

Las plantas *sos1-1*, tras una semana en Na^+ , no exhibieron una inhibición significativa de su crecimiento en concentraciones de Na^+ menores a 10 mM NaCl (Tabla R3). Sin embargo, tras dos semanas a 2 mM NaCl, las plantas *sos1-1* mostraron una moderada inhibición del crecimiento de la roseta y de la raíz, y a 4 mM NaCl una inhibición de aproximadamente 50% en la roseta y casi completa de la raíz (Figura R14; Tabla R4).

Al analizar el contenido en Na^+ de las plantas *sos1-1*, pudimos comprobar que, como era de esperar, las plantas mutantes acumulaban un exceso de Na^+ en la raíz, lo que podía detectarse incluso en plantas creciendo una semana a 0,2 mM NaCl. Siendo la ratio de Na^+ Roseta / Na^+ Raíz de entre 1,0 y 1,2 en las concentraciones ensayadas (Tabla R3).

La ratio molar Na^+/K^+ en la roseta de plantas *sos1-1*, tras una semana de tratamiento en 4 mM NaCl, fue de 0,54, menor que 1 (Figura R12B; Tabla R3). A pesar de ello, se observó una inhibición significativa del crecimiento de la roseta (Figura R14, Tabla R4) que no podemos atribuir al efecto de la toxicidad del Na^+ . Estas rosetas no presentaban ningún signo de amarilleamiento, al contrario, eran de un color verde oscuro típico de hojas con

alto contenido en antocianinas. En el caso de la raíz del mutante *sos1-1* los resultados tras una semana de tratamiento mostraron que a 4 mM NaCl la ratio Na^+/K^+ de 0,56 (Tabla R3), que superaba el límite de 0,32 que habíamos establecido como “seguro” para la raíz de plantas Col-0 (Figura R12A; Figura R5). Además, a esta concentración había una inhibición casi total del crecimiento de la raíz (Figura R14; Tabla R4). Descartando efectos osmóticos a estas concentraciones de Na^+ externo, la alta ratio Na^+/K^+ en la raíz de *sos1* parece ser la causa de un efecto tóxico sobre el sistema radicular del mutante. De este modo inferimos, que en el caso del mutante *sos1*, la inhibición del crecimiento de la roseta no ocurre como consecuencia de un efecto de toxicidad del Na^+ causado por una alta ratio Na^+/K^+ sino como respuesta al fracaso en el crecimiento de la raíz (Figura R14; Tabla R4).

Figura R14. Inhibición en el crecimiento de plantas *sos1-1*, expuestas dos semanas a concentraciones de NaCl inocuas para las plantas control *gll*. Se representan medias y SD de 8 plantas. Distinta letra indica una diferencia significativa en un test t-student con una $p < 0.05$. Para mayor claridad se usan letras negritas, minúsculas e itálicas para cada órgano distinto.

3.2.1.3.3 Síntomas asociados a la toxicidad del Na^+ en parte aérea y en raíz.

Para investigar las diferencias entre la toxicidad del Na^+ en la parte aérea y en la raíz decidimos realizar ensayos con ambos mutantes en concentraciones de NaCl más elevadas y que causaran una inhibición del crecimiento comparable entre ambas. Para ello crecimos plantas *hkt1-4* y *sos1-1* en paralelo a 16 y 5 mM NaCl respectivamente. Estas concentraciones seleccionadas produjeron una inhibición del crecimiento de la parte

aérea de ambos mutantes de aproximadamente un 60% en la segunda semana de exposición al NaCl pero las plantas se mantuvieron vivas y capaces de florecer. Tras una semana de crecimiento a estas concentraciones las diferencias en tamaño ya eran notables. Las plantas *hkt1-4* a 16 mM NaCl empezaron a amarillear y las *sos1-1* a 5 mM NaCl presentaron un aspecto oscurecido (Figura R15A).

A

B

Figura R15. Aspecto de plantas *hkt1-4* y *sos1-1* expuestas a 16 y 5 mM NaCl respectivamente en comparación con las plantas control: *gll*, *sos1-1* y *hkt1-4* a 0,2 mM NaCl y *gll* a 16 y 5 mM NaCl. Las plantas crecieron dos semanas en 0,2 mM NaCl y se transfirieron a las concentraciones de Na⁺ indicadas. A, aspecto tras una semana en Na⁺. B, aspecto tras dos semanas en Na⁺.

A las dos semanas de tratamiento salino, las diferencias en tamaño fueron muy significativas (Figura R15B). Las rosetas de las plantas *hkt1-4* presentaron muchas hojas con aspecto senescente y amarillento mientras que las rosetas de las plantas *sos1-1* presentaron muchas hojas púrpuras y verde oscuro que recordaban a los mutantes enanos descritos por Clouse y Langford (1996). Por otro lado, las raíces de ambos mutantes eran más pequeñas que las de plantas control, si bien, las del mutante *sos1-1* estaban más fuertemente inhibidas. Los valores de las ratios molares de Na^+/K^+ en estas plantas eran consistentes con lo arriba descrito. En plantas *hkt1-4* tras 1 semana a 16 mM NaCl las ratios Na^+/K^+ fueron: raíz = $0,04 \pm 0,01$, roseta = 12 ± 1 mientras que para plantas *sos1-1* tras una semana a 5 mM NaCl fueron: raíz = $2,2 \pm 0,3$, roseta = $1,4 \pm 0,1$. Las ratios de 12 y 2,2 están asociadas, como ya hemos mencionado, con toxicidad de roseta y de raíz respectivamente.

Debido a la coloración característica que habían adquirido las rosetas en nuestros mutantes, decidimos analizar los contenidos en antocianinas y clorofila de la parte aérea de plantas *hkt1-4* y *sos1-1*. Así tras una semana de tratamiento con Na^+ , las plantas *hkt1-4* a 16 mM Na^+ y *sos1-1* a 5 mM Na^+ , presentaron contenidos en antocianinas muy similares y cuatro veces superiores a los de las plantas control (Figura R16A). Tras dos semanas en Na^+ los contenidos en antocianinas en plantas *gll* y *hkt1-4* no aumentaron respecto a la primera semana, sin embargo, aumentaron seis veces las antocianinas en las plantas *sos1-1*.

Figura R16. Contenido en antocianinas y clorofila (a más b) en rosetas de plantas control y plantas *hkt1-4* y *sos1-1* expuestas a 16 y 5 mM NaCl respectivamente. A, antocianinas de plantas tras una y dos semanas en NaCl. B, clorofila total de plantas tras una semana en NaCl. Se representan medias y SD de 3 plantas.

Por otro lado, un análisis preliminar de los niveles de clorofila total (clorofila a más clorofila b), tras una semana de tratamiento con sal, determinaron un menor contenido de clorofila en las plantas *hkt1-4* en comparación con plantas control y *sos1-1* (Figura R16B).

En resumen, podemos distinguir distintos síntomas asociados a la toxicidad del Na^+ . En primer lugar, una clorosis en la roseta está asociada a ratios molares Na^+/K^+ que son tóxicos. En segundo lugar, una inhibición en el crecimiento de la raíz y de la parte aérea puede ser independiente del efecto tóxico del Na^+ y ser reflejo de la inhibición del crecimiento en el otro órgano. En tercer lugar, la acumulación de antocianinas en las hojas que está asociada a la inhibición del crecimiento parece ser independiente de ratios molares tóxicos en las hojas y reflejar la toxicidad en la raíz.

3.2.1.4 Origen de la inhibición del crecimiento por NaCl en *Arabidopsis thaliana*

Ya se ha descrito que las plantas Col-0 sufrieron una inhibición significativa del crecimiento a partir de 40 mM NaCl (Figura R3; Figura R7 y Tabla R1). Una vez estimados los ratios molares “críticos” de Na^+/K^+ que estaban asociados a la toxicidad por Na^+ en las rosetas y las raíces de las plantas *hkt1* y *sos1* pudimos compararlos con los obtenidos para plantas Col-0 que habían crecido en concentraciones crecientes de NaCl externo (Tabla R1; Tabla R2) y de este modo estimar si a una concentración determinada de NaCl externo se producía intoxicación por Na^+ . Así, se observó que a 40 mM NaCl externo la toxicidad por Na^+ en raíces y rosetas era moderada mientras que era severa a partir de 60 mM. Podíamos entonces suponer que fuese la toxicidad del Na^+ sobre la raíz o sobre la parte aérea la causa de la inhibición de crecimiento que sufrían las plantas Col-0 cuando crecían en NaCl a concentraciones superiores a 40 mM (Figura R3, Figura R7). Sin embargo, no podíamos descartar que la inhibición se produjera por otros motivos. Por ello, el estudio se continuó utilizando otra accesión, Ts-1, y forzando cambios en los contenidos de Na^+ .

3.2.1.4.1 Inhibición del crecimiento sin toxicidad

La accesión Ts-1 porta un gen *HKT1* hipomórfico que conduce a la acumulación de un alto contenido en Na^+ en la parte aérea y, sin embargo presenta un aumento en la

tolerancia a la sal (Rus et al., 2006; Baxter et al., 2010). Por ello, la comparación de la tolerancia a NaCl de las accesiones Ts-1 y Col-0 en nuestras condiciones de trabajo podía arrojar luz sobre las causas de la inhibición del crecimiento de *Arabidopsis* en NaCl. No obstante, un problema importante era la floración, que, como se ha descrito, incrementaba notablemente el contenido en Na^+ de la roseta. En nuestras condiciones de ensayo Ts-1 no florecía y, por ello solo debía compararse con Col-0 cuando la exposición a NaCl de esta última era solo de una semana y por tanto no había florecido todavía.

Los resultados de los ensayos realizados con las plantas Ts-1 (Figura R4 y Tabla R1) fueron similares a los ya descritos con Col-0. Ambas accesiones respondían igual al NaCl en términos de inhibición en el crecimiento (Figura R17), pero muy diferente en términos de acumulación y signos de toxicidad en la roseta (Figura R4B y Figura R7B). Así, a 60 mM NaCl, ambas accesiones inhibían su crecimiento en torno a un 50% pero, mientras en Col-0 muchas hojas presentaban estos signos de intoxicación (Figura R7B) en las plantas Ts-1, solo los cotiledones y raramente las dos primeras hojas mostraron signos de senescencia o amarilleamiento (Figura R4B). En relación al contenido de Na^+ , las ratios de Na^+/K^+ de plantas Ts-1 tras dos semanas a 60 mM NaCl fueron de 8,8 en parte aérea y 0,28 en raíz, muy diferentes de las ratios de 2,8 y 1,3 para parte aérea y raíz de Col-0 tras una semana a la misma concentración de NaCl. Incluso después de dos semanas en NaCl, Ts-1 sin florecer y Col-0 florecido, las ratios Na^+/K^+ difícilmente justificaban los signos de toxicidad en Col-0 y la ausencia de los mismos en Ts-1. Por otra parte, la comparación del crecimiento con los contenidos en Na^+ en las dos accesiones sugería que el contenido en Na^+ y la inhibición del crecimiento no estaban asociados.

Para demostrar o rechazar la hipótesis de la asociación, decidimos utilizar combinaciones isotónicas de NaCl y KCl (Lauter et al., 1988; Benlloch et al., 1994; Kinraide, 1999;) Por este procedimiento podíamos cambiar las ratios de Na^+/K^+ de raíces y partes aéreas sin alterar la osmolaridad, observando de manera sencilla el efecto de este cambio sobre el crecimiento. Un exceso de KCl en el medio podría conducir a un exceso del ión K^+ en la planta que conllevara una intoxicación por K^+ , pero combinaciones de KCl y NaCl resultan menos tóxicas que las sales separadas (Benlloch et al., 1994; Kinraide, 1999). En nuestras condiciones, una concentración de K^+ hasta 20 mM (con 40 mM Na^+), equivalente al K^+ en el medio MS (Murasnige and Skoog, 1962) no era tóxica.

NaCl (mM)	Col-0 Una semana en Na ⁺		
	Raíz (ratio molar)	Roseta (ratio molar)	Na ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)
0,2	< 0,01	0,018 ± 0,004	21,4±5,3
20	0,32 ± 0,03	0,66 ± 0,05	493±38
40	0,78 ± 0,12	1,8 ± 0,3	929±99
60	1,3 ± 0,3	2,8 ± 0,2	1327±87
80	1,3 ± 0,2	4,3 ± 0,5	1764±203

NaCl (mM)	Ts-1 Dos semanas en Na ⁺		
	Raíz (ratio molar)	Roseta (ratio molar)	Na ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)
0,2	< 0,01	0,016 ± 0,002	27,9±2,1
20	0,15 ± 0,01	3,1 ± 0,2	1844±115
40	0,23 ± 0,01	5,8 ± 0,3	2828±87
60	0,28 ± 0,04	8,8 ± 1,0	3446±162
80	0,43 ± 0,03	19,2 ± 2,8	4318±380

Figura R17. Relación entre la inhibición del crecimiento y el contenido en Na⁺ en Col-0 y Ts-1 expuestas a concentraciones crecientes de NaCl desde 0,2 a 80 mM. Se representan medias y SD de 8 plantas.

Para realizar nuestros ensayos, transferimos plantas Col-0 y Ts-1 de dos semanas a medio de crecimiento suplementado con diferentes combinaciones de KCl y NaCl (mM): 5-55, 10-50, y 20-40, en paralelo con el control 1 -0.2 (KCl - NaCl) mM y la condición de inhibición 1-60 (KCl-NaCl) mM. Tras dos semanas en el medio de ensayo observamos que, como era esperable, sustituir Na⁺ por K⁺ reducía de manera muy notable las ratios Na⁺/K⁺ tanto en las raíces como en las partes aéreas en ambas accesiones (Figura R18A; Tabla R5). Sin embargo, la inhibición en el crecimiento resultó ser igual para todas las combinaciones isotónicas independientemente de la accesión (Figura R18B). Estos ensayos confirman que la inhibición de crecimiento observada en Ts-1 y Col-0 era independiente de la toxicidad del Na⁺, que se manifestaba en Col-0 por las hojas amarillas. Además, estos síntomas, desaparecieron a partir de la combinación 5-55 (Figura R18C), confirmando de esta manera que se trata de un verdadero síntoma consecuencia de la naturaleza tóxica del Na⁺, pero que no era la causa principal de la inhibición del crecimiento en Col-0 y Ts-1.

Figura R18. Respuesta en el crecimiento de plantas Col-0 y Ts-1 al incremento de K⁺ en combinaciones isotónicas de 60 mM KCl-NaCl en comparación con condiciones control 0,2 mM Na⁺ y de inhibición 60 mM Na⁺ (1-0,2 y 1-60 (KCl-NaCl mM respectivamente). Efecto sobre A, las ratios molares Na⁺/K⁺ y B, el peso seco, de raíz, roseta e inflorescencia (solo en Col-0). C, aspecto de plantas Col-0 y Ts-1 expuestas dos semanas a combinaciones isotónicas de 60 mM KCl-NaCl; C, El amarilleamiento de plantas Col-0 en 60 mM NaCl desapareció cuando se incrementa a 5 mM. (Las plantas en 1-0,2 se muestran en una escala menor al ser mucho más grandes que las otras. Se cortó la inflorescencia para una mayor observación de la roseta). A y B, distinta letra indica una diferencia significativa en un test t-student con una $p < 0,05$; B, diferencias estadísticamente dignificativas en las plantas Col-0 se calcularon teniendo en cuenta el peso seco de la parte aérea (roseta + inflorescencia).

Tabla R5. Peso seco y contenidos en Na^+ y K^+ de plantas Col-0 y Ts-1 expuestas dos semanas a diferentes combinaciones isotónicas de KCl y NaCl donde ambas sales suman siempre 60 mM.

Línea	K ⁺ - Na ⁺ (mM)	Raíz				Roseta				Inflorescencia			
		Peso seco (mg)	K ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)	Na ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)	Na ⁺ /K ⁺ (ratio molar)	Peso seco (mg)	K ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)	Na ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)	Na ⁺ /K ⁺ (ratio molar)	Peso seco (mg)	K ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)	Na ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)	Na ⁺ /K ⁺ (ratio molar)
Col-0	1-0,2	6,5±1,9	1574±150	9,8±0,8	<0,01	23±3	1371±94	22,3±2,3	0,016±0,02	24±4	1815±66	14,3±0,6	<0,01
	1-60	3,6±0,3	928±83	1443±185	1,56±0,18	11,3±1,8	216±36	2283±242	11,3±2,2	13,2±1,8	1095±81	735±51	0,66±0,07
	5-55	4,4±0,8	1280±133	1059±147	0,83±0,1	10,8±1,7	607±119	1518±123	2,6±0,8	9,9±4,0	1350±189	581±65	0,41±0,04
	10-50	4,8±0,7	1546±177	766±97	0,50±0,05	9,9±1,1	1259±155	1405±129	1,1±0,1	11,8±1,7	1717±283	381±31	0,23±0,03
	20-40	3,2±0,5	1709±63	439±53	0,26±0,02	11,8±1,3	2486±78	786±121	0,32±0,04	6,9±2,3	2525±678	295±36	0,12±0,02
Ts-1	1-0,2	4,7±1,1	1365±144	4,1±0,7	<0,01	26,4±5,6	1525±64	30,7±2,5	0,020±0,002				
	1-60	2,9±0,4	1586±95	528±54	0,33±0,04	12,3±1,9	396±33	3457±240	8,8±0,3				
	5-55	3,6±0,7	1860±231	436±75	0,23±0,02	12,4±1,8	656±43	2676±120	4,1±0,4				
	10-50	3,8±0,5	1818±217	315±22	0,18±0,02	12,9±1,0	1153±55	2178±154	1,89±0,06				
	20-40	3,8±0,6	2202±174	239±24	0,11±0,04	12,7±1,6	1917±99	1334±111	0,69±0,03				

3.2.1.4.2 Caracterización del efecto osmótico

Un efecto osmótico era una causa obvia que podía explicar las inhibiciones de crecimiento descritos a concentraciones altas de NaCl. Pero abordar esta hipótesis no resultaba fácil ya que no existe en la actualidad un buen ensayo para disminuir el potencial osmótico sin usar sales, ya que la mayor parte de los compuestos que se utilizan para producir un estrés osmótico también producen toxicidad (Plaut and Federman, 1985), o inducen el crecimiento de bacterias como sucede con el uso de azúcares.

En estas circunstancias, para obtener algún indicio, realizamos ensayos en condiciones estériles utilizando combinaciones isotónicas de sales de K^+ y Na^+ (10-50 KCl-NaCl mM) o con sorbitol, y medimos el contenido de agua de las rosetas con la ratio peso fresco/peso seco, que nos sirvió como indicador de la adaptación osmótica (Handa et al., 1983).

Los resultados mostraron que las accesiones Col-0 y Ts-1 creciendo en 120 mM sorbitol redujeron el contenido en agua a la mitad, en comparación con el control. Llamativamente, esta reducción no ocurrió en plantas tratadas con 10-50 (KCl- NaCl) mM (Figura R19A). Cuando analizamos el contenido en cationes (K^+ más Na^+) relativo a al peso seco, observamos un incremento significativo en el contenido de cationes en la condición 10-50 (KCl- NaCl) mM y un descenso en la condición de sorbitol (Figura R19B). Esto sugiere que las plantas en 10-50 (KCl-NaCl) mM, se ajustan osmóticamente al potencial de agua más negativo incrementando el contenido en K^+ y Na^+ .

Figura R19. Ajuste osmótico de plántulas Col-0 y Ts-1 germinadas y crecidas dos semanas en cubetas en condiciones de esterilidad. Medio sólido a base de agarosa que contiene los nutrientes del medio hidropónico suplementado con: 1 mM KCl + 0,2 mM NaCl (condiciones control), 10 mM KCl + 50 mM NaCl ó 1 mM KCl + 120 mM Sorbitol. A, ratio Peso Fresco / Peso Seco. B, Contenido en K⁺ + Na⁺ Se representan media y SD de 6 grupos de rosetas.

Para apoyar aún más estos resultados, plantas de *Arabidopsis* pertenecientes a diferentes accesiones crecidas en cultivo hidropónico durante dos semanas se transfirieron a condiciones control y a dos condiciones inhibitorias 10-50 y 1-60 (KCl-NaCl) mM, que inhibían similarmente el crecimiento con contenidos muy diferentes en Na⁺. Tras una semana en los distintos medios de ensayo, la ratio peso fresco/peso seco indicó que a pesar de haberse observado inhibición en el crecimiento en todas las accesiones ensayadas, no hubo diferencias significativas en el contenido de agua de las plantas, independientemente de la accesión y de las ratios Na⁺/K⁺ alcanzados (Figura R20A). Además, el contenido total de iones K⁺ más Na⁺ referido al peso seco en ambas condiciones era similar y, como era de esperar, mucho más elevado que en la condición control (figura R20B).

Estos resultados muestran que en concentraciones moderadas de NaCl, la inhibición del crecimiento que sufre *Arabidopsis* no está causada por un déficit hídrico y que las plantas salinizadas en estas condiciones se ajustan osmóticamente aumentando el contenido de cationes.

Figura R20. Accesiones de *Arabidopsis* expuestas una semana a condiciones control (1 mM KCl + 0,2 mM NaCl) y a dos condiciones inhibitorias: 1 mM KCl + 60 mM Na^+ y 10 mM KCl + 50 mM NaCl. A, ratio Peso Fresco / Peso Seco tras una semana de ensayo. B, Contenido en $K^+ + Na^+$ de las rosetas. Se representan media y SD de 6 rosetas de cada accesión.

3.2.1.5 Papel del Na^+ en la respuesta osmótica de las plantas al estrés salino

3.2.1.5.1 Ajuste osmótico en condiciones de salinidad moderada

La hipótesis de ajuste osmótico con el aumento de cationes no es nueva en el caso de plantas halófilas y desde hace años se ha propuesto también en glicofitas que el Na^+ es un osmótico de bajo coste para la planta (Pardo and Quintero, 2002; Cuin et al., 2009; Flowers et al., 2015). En condiciones de salinidad, la planta acumularía Na^+ para evitar un déficit hídrico y mantener la presión de turgencia. En nuestros ensayos esto parece ocurrir a concentraciones moderadas de NaCl (hasta 60 mM), sin embargo, era necesario evaluar la osmolalidad interna de las plantas para verificar que existía una relación entre contenido en cationes Na^+ y K^+ y el ajuste osmótico. Para ello, realizamos una serie de ensayos con plantas de las accesiones Col-0 y Ts-1, donde a lo largo de 12 días evaluamos los contenidos en Na^+ y K^+ a la vez que el potencial osmótico en las rosetas de plantas tratadas con 60 mM NaCl (Figura R21).

Figura R21. Osmolalidad interna y contenidos en Na⁺ y K⁺ de plantas Col-0 y Ts-1 expuestas 12 días a condiciones control, 1 mM KCl + 0,2 mM NaCl y a condiciones de salinidad 1 mM KCl + 60 mM NaCl

Los resultados de estos análisis fueron sorprendentes, poniendo de manifiesto respuestas inesperadas. En principio, la curva de la osmolalidad en la roseta presentó la respuesta esperable de plantas que se están adaptando a un choque osmótico. Al margen de algunas diferencias en la respuesta temporal, irrelevantes en el actual nivel de conocimientos, tanto las plantas Col-0 como las Ts-1 tuvieron el mismo comportamiento, ganando algo más de 200 mOsm/L en 12 días (259 mOsm/L Col-0 y 212 mOsm/L Ts-1). Esa ganancia fue considerablemente mayor que la esperada para nuestra solución de 60 mM NaCl (120 mOsm/L; a esta concentración de NaCl, la diferencia entre osmolalidad y osmolaridad no es significativa para la interpretación de nuestros resultados). Más sorprendente aún fue que después de 12 días la osmolalidad siguió aumentando. Necesariamente, o la presión de turgencia de las células de la roseta había aumentado o había más Na^+ en el apoplasto y el incremento en la presión de turgencia se había trasladado a la raíz.

El análisis de los contenidos de K^+ más Na^+ puso de manifiesto que la adquisición de Na^+ justificaba sobradamente el aumento de la osmolalidad en la roseta. En este caso lo sorprendente vino de las plantas Ts-1. En Col-0 el incremento en el contenido de Na^+ más K^+ (1500 nmol mg^{-1} , que equivalen aproximadamente a 300 mOsm/L) resultó más del doble de la adaptación que se necesita a la exposición a 60 mM NaCl. En Ts-1 el incremento en Na^+ más K^+ (2732 nmol mg^{-1} , que equivalen aproximadamente a 550 mOsm/L), superó en casi cinco veces lo que se necesitaba para esa adaptación.

Estos resultados fueron suficientes para las conclusiones que requería nuestro estudio: la adquisición de Na^+ y de un anión, probablemente cloruro, explicaban la adaptación osmótica. Pero, ciertamente, dejaban muchas preguntas en el aire; por ejemplo, que en Ts-1 había mucho Na^+ que no era osmóticamente activo, pero que no eran el objetivo de esta tesis.

3.2.1.5.2 Ajuste osmótico en condiciones de alta salinidad

Como ya se ha dicho, las plantas de *Arabidopsis* creciendo en condiciones de esterilidad a 120 mM sorbitol muestran una reducción muy significativa del contenido en agua, hecho que no ocurre en plantas a 60 mM NaCl independientemente de las condiciones de crecimiento (Figura R19A). Esto parece indicar que el Na^+ participa en el ajuste osmótico de la planta cuando esta se encuentra en un medio con bajo potencial hídrico, evitando o aliviando el déficit hídrico y los daños subsiguientes. Este ajuste osmótico no podía ser ensayado en nuestras condiciones utilizando medio hidropónico y sorbitol, ya que el

sorbitol induce crecimiento microbiano que podría afectar a los resultados (Munns et al., 2010). Sin embargo, era necesario comparar el ajuste osmótico en sorbitol y salinidad en condiciones de hidroponía. Para ello, diseñamos una serie de ensayos a tiempos cortos (hasta 24 horas), donde el crecimiento bacteriano no fuese un obstáculo para la interpretación de resultados y pudiésemos verificar que, a bajos potenciales osmóticos, las condiciones salinas permitían el ajuste osmótico en la planta mientras que los compuestos osmóticos no iónicos no lo permitían. Para dichos ensayos utilizamos un potencial osmótico de -1.0 Mpa correspondiente a 400 mOsm. En ensayos preliminares habíamos observado el choque osmótico producía una pérdida rápida del K^+ de la raíz, en coincidencia con lo que estaba ya descrito (Shabala et al., 2006; Britto et al., 2010; Demidchik 2014). Esto ocurría tanto en tratamientos con sorbitol como con NaCl, donde la pérdida era aún más rápida que en sorbitol. Utilizando un suplemento de 20 mM KCl con 180 mM NaCl y 1 mM KCl con los tratamientos de Sorbitol, (en ambos casos el medio base fue 5 mM MES- $Ca(OH)_2$, ver Materiales y Métodos, sección 2.5.3.2) las pérdidas de K^+ disminuyeron y se igualaron en ambos tratamientos eliminando así la posibilidad de que pérdidas diferentes en el contenido de K^+ en la raíz causaran una respuesta distinta. Los ensayos se realizaron con líneas de accesiones Col-0 y Ts-1, pero también con C24 y el mutante *hkt1-4* por ser los mayores acumuladores de Na^+ en la parte aérea. Todos dieron lugar a resultados similares y una respuesta casi idéntica de marchitamiento. Se muestran foto de la accesión Ts-1 (Figura R22) y películas de la accesión Ts-1 con plantas de tres y cinco semanas (Películas R1 y R2) (ver Material y Métodos sección 2.5.3.2).

Los resultados mostraron que las plantas en 370 mM sorbitol con 1 mM KCl, comenzaron a marchitarse en menos de una hora, aumentando el marchitamiento de manera continuada hasta el final del ensayo a las 24 horas (Figura R22). En NaCl, sin suplementar o suplementado con 20 mM KCl, el marchitamiento inicial fue igual o más rápido que en sorbitol, pero fue transitorio y las plantas se recuperaban en unas horas. Las plantas de tres semanas se recuperaron en 6-7 horas (Película R1) y las plantas de cinco semanas en 10-12 horas (Película R2). Además, la recuperación parecía acelerarse durante la oscuridad. Atendiendo a los contenidos en cationes internos (Tabla R6), el marchitamiento transitorio estaba asociado a un aumento en los contenidos internos de $Na^+ + K^+$ y por tanto a un ajuste osmótico de la planta.

Figura R22. Marchitamiento transitorio y permanente de plantas TS-1 de 5 semanas de edad crecidas en medio hidropónico y transferidas durante 24 h a un medio a base de 5 mM MES–Ca(OH)₂ pH 6.15 suplementado con los compuestos indicados en la foto a 400 mOsm. Las concentraciones exactas fueron 370 mM sorbitol + 1 mM K⁺, 200 mM NaCl, 200 mM KCl, y 266 mM MES neutralizado con 133 mM NaOH). Se tomaron fotos a lo largo de 24 h de ensayo.

Tabla R6. Contenido en Na⁺ más K⁺ de las plantas de la Figura R22 que sufrieron marchitamiento transitorio y permanente. Análisis a las 24 h.

Medio ^a	Marchitamiento	Molalidad del medio (mOsm)	K ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)	Na ⁺ /PS (nmol mg ⁻¹)	(Na ⁺ +K ⁺)/PS (nmol mg ⁻¹)	Na ⁺ /K ⁺ (ratio molar)
370 mM Sorbitol, 1 mM KCl	Permanente	401	1690	3,3	1694	0,002
200 mM NaCl	Transitorio	385	1489	1440	2929	0,967
200 mM KCl	Transitorio	387	2804	4,4	2808	0,002
266 mM MES-Na(OH) (133 mM Na ⁺)	Permanente	394	1537	174	1712	0,113

Seguidamente ensayamos una serie de compuestos para comprobar los marchitamientos transitorios sobre plantas de las líneas anteriormente mencionadas (Tabla 7).

Las plantas en medios salinos (sales de Na^+ y K^+ de Cl^- ó SO_4^{2-}) respondieron de forma idéntica a la descrita arriba. Con el resto de compuestos en cambio, el marchitamiento fue siempre de carácter permanente, incluso en presencia de Na^+ como en Na/MES, ó Cl^- como en N-methyl-D-glucamine (NMDG)/Cl. En resumen, la recuperación del marchitamiento dependía de la presencia de un anión inorgánico, Cl^- o SO_4^{2-} , y de Na^+ o K^+ (Tabla R7). La presencia de cualquiera de ellos por separado: Na/MES o N-methyl-D-glucamine (NMDG)/Cl no daba lugar a la recuperación.

Tabla R7. Marchitamiento transitorio y permanente de plantas Ts-1. La caracterización del tipo de marchitamiento se realizó en ensayos a 24 h utilizando un medio basal de 5 mM MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH 6,15 suplementado con los diferentes componentes, a una osmolalidad final de 400 mOsm.

Medio	Tipo de marchitamiento
180 mM NaCl, 20 mM KCl	Transitorio
160 mM NaCl, 20 mM NaNO_3 , 20 mM KCl	Transitorio
200 mM NaCl	Transitorio
200 mM KCl	Transitorio
133 mM Na_2SO_4	Transitorio
133 mM K_2SO_4	Transitorio
370 mM Sorbitol	Permanente
370 mM Manitol	Permanente
266 mM MES- $\text{Na}(\text{OH})$ (133 mM Na^+)	Permanente
266 mM MES- $\text{K}(\text{OH})$ (133 mM K^+)	Permanente
200 mM NMDG- Cl^a (200 mM Cl^-)	Permanente
133 mM NMDG-MES (266 mM MES)	Permanente
350 mM Sorbitol, 20 mM NaNO_3	Permanente
370 mM Sorbitol, 1 mM KCl	Permanente

^a NMDG, N-methyl-D-glucamine

A continuación, se midió la reducción en el contenido en agua de las plantas sometidas al choque osmótico. En los ensayos con sorbitol a 370 mM, el contenido en agua se redujo progresivamente a lo largo del ensayo siendo del 34% a las 6 horas y del 50% a las 24 horas. En 200 mM NaCl el contenido en agua se redujo de manera más lenta llegando al

15% a las 6 horas, sin que en ningún caso hubiera mayor pérdida y en algunos con apreciable recuperación a partir de las 6 h (Tabla R8).

Tabla R8. Porcentaje de pérdida de agua en plantas expuestas a 370 mM Sorbitol ó 200 mM NaCl tras 6 y 24 h de choque osmótico. Se representan, valores medios $\pm$ SD. b, Ts-1, Col-0, C24 y plantas *hkt1-4*; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas accesiones ni el mutante. c, Plantas Ts-1. n = número de plantas en cada tratamiento.

Tiempo	Sorbitol	NaCl
(h)	(%) Pérdida de agua	
6	34 ± 4 ($n = 45$) _b	15 ± 4 ($n = 50$) _b
24	50 ± 6 ($n = 11$) _c	$8 - 16$ ($n = 11$) _c

En coherencia con los resultados obtenidos en las adaptaciones osmóticas a largo plazo, la recuperación del marchitamiento transitorio en NaCl estuvo asociado a un incremento en el contenido en Na^+ en la parte aérea tras 24 horas de tratamiento. De igual forma, el marchitamiento de plantas en presencia de sales de K^+ se asoció a un aumento en el contenido de K^+ en la parte aérea similar al que encontramos para el Na^+ (Tabla R6).

Las plantas tratadas con osmóticos no iónicos que originaban marchitamientos permanentes, como sorbitol o manitol, no aumentaron el contenido de iones Na^+ y K^+ , como era de esperar, ya que estos cationes estaban ausentes del medio de ensayo. Sin embargo, las plantas en Na/MES mostraron marchitamiento permanente y un pequeño aumento del contenido en Na^+ en la parte aérea, a pesar de contar con una concentración de sodio alta en el medio externo (133 mM Na^+). Algo similar ocurrió en K^+ /MES donde las plantas también sufrieron marchitamiento permanente, pero ni siquiera se llegó a detectar un aumento apreciable del contenido en K^+ .

Estos ensayos indican que el marchitamiento transitorio sufrido por las plantas de *Arabidopsis* está asociado a pérdidas moderadas de agua e incrementos notables en los contenidos de Na^+ más K^+ mientras que en las plantas que sufren marchitamiento permanente, las pérdidas de agua son muy significativas y el aumento en Na^+ o K^+ es muy

bajo o inexistente. Esto ocurre incluso cuando estos cationes están presentes en el medio de ensayo, si falta un anión pequeño y transportable como Cl^- o SO_4^{2-} .

3.2.2 Variación natural de la tolerancia a la salinidad en *Arabidopsis thaliana*

3.2.2.1 *Tolerancia a la salinidad de accesiones de Arabidopsis thaliana*

Está comúnmente aceptado que la sensibilidad de las plantas al sodio está causada por los efectos tóxicos del ión sobre las hojas (Maathuis and Amtmann, 1999; Blumwald et al., 2000; Horie et al., 2008; Munns and Tester, 2008; Hauser and Horie, 2010) e incluso se argumenta, que el aumento en la actividad transportadora del HKT1 reduce el contenido en Na^+ de la parte aérea e incrementa la tolerancia al Na^+ (Farquharson, 2009; Moller et al., 2009; Plett et al., 2010). Sin embargo, en resultados ya expuestos (Tabla R5), habíamos observado una inhibición del crecimiento similar de plantas Col-0 (con un HKT1 hipermórfico) y Ts-1 (con un HKT1 hipomórfico) en presencia de NaCl, con independencia del contenido de Na^+ en la roseta, lo que lleva a pensar que el transportador HKT1 no es el responsable de dicha inhibición a pesar de estar implicado en la diferente distribución de Na^+ entre las accesiones. También habíamos comprobado que la intoxicación por Na^+ que sufrían las plantas Col-0 expuestas a 60 mM Na^+ no era la responsable principal de la inhibición en su crecimiento, y que las plantas Ts-1 eran menos sensibles a los daños por toxicidad a pesar de acumular más Na^+ en sus hojas. Ante estas contradicciones, había que demostrar que Col-0 y Ts-1 no eran excepciones dentro de la especie de *Arabidopsis* por lo que decidimos realizar un estudio de variabilidad natural entre accesiones de *Arabidopsis* sometidas a condiciones de salinidad. De este modo, podríamos identificar algunas accesiones que en condiciones salinas presentaran los mismos signos de daño por toxicidad de Na^+ en la parte aérea que el mutante *hkt1-4* que habíamos tomado como modelo. De esta manera, podríamos relacionar la intoxicación por Na^+ con la actividad de HKT1. Con este objetivo, ensayamos 18 accesiones (Ver Materiales y Métodos Tabla M2 en sección 2.2.3). Tres de estas accesiones, Ak-1, C24, y Fei-0, presentaron un fenotipo similar al del mutante *hkt1-4* y no llegaron a sobrevivir dos semanas en 60 mM NaCl (Ak-1 tan solo una semana). La Figura R23 muestra un resumen de 7 de estas 18 accesiones estudiadas que incluye a las más sensibles y más tolerantes respectivamente.

Además, se utilizaron combinaciones isotónicas de NaCl y KCl y después de experimentos preliminares, se ensayó el crecimiento a 15–45 (KCl -NaCl) mM frente a 1–60 (KCl -NaCl) mM en las 18 accesiones. Los resultados mostraron que todas las accesiones redujeron notablemente el peso seco de las rosetas en las condiciones inhibitorias 1–60 (KCl -NaCl) mM y 15–45 (KCl -NaCl) mM, comparadas con la condición control 1–0,2 (KCl -NaCl) mM. Sin embargo, sólo algunas presentaron una inhibición en el crecimiento asociadas a un efecto tóxico del Na⁺. Las Figuras R23 y R24 muestran los resultados de inhibición del crecimiento de las rosetas en las accesiones más sensibles y más tolerantes.

Figura R23. Diferencias en la sensibilidad al Na⁺ de accesiones de *Arabidopsis* expuestas dos semanas a 1–0,2, 1–30, 1–60 y 15–45 KCl-NaCl mM. El aspecto senescente de las hojas de las accesiones Ak-1, C24 y Fei-0 se asemejan al de las plantas mutantes *hkt1* intoxicadas por Na⁺. ^a Las plantas Ak-1 en 1-60 (encuadradas en rojo), murieron a la semana de tratamiento.

Figura R24. Inhibición en el crecimiento de accesiones de *Arabidopsis* expuestas dos semanas a las condiciones control 1–0.2 mM KCl-NaCl y a dos combinaciones isotónicas 1–60 y 15–45 mM KCl-NaCl. El aumento en el K^+ externo mejoró el crecimiento de algunas accesiones pero no de otras. ^a Los pesos de Ak-1, C24 y Fei-0 corresponden a plantas con el aspecto senescente de la figura 22. Las plantas Ak-1 en 1-60 murieron a la semana de tratamiento. Se representan medias y SD de 6 plantas.

Cuando comparamos las condiciones 1-60 (KCl -NaCl) mM y 15-45 (KCl -NaCl) mM observamos que, al aumentar el K^+ externo mejoraron mucho los signos de toxicidad por Na^+ de las accesiones afectadas, o incluso desaparecieron, como en C24. Sin embargo, el crecimiento siguió significativamente inhibido, si bien algo menos. En cuanto a las ratios molares de Na^+/K^+ observamos como a 1-30 (KCl -NaCl) mM ya se apreciaron las diferencias entre accesiones, tanto en raíz como en parte aérea (Tabla R9). Especialmente se diferenciaron accesiones con *HKT1* hipomórfico como C24 y Tsu-1 (Buescher et al., 2010; Jha et al., 2010). En 15-45 (KCl -NaCl) mM, una disminución en las ratios internas Na^+/K^+ de las rosetas hasta valores más bajos que los encontrados en la condición 1-60 (KCl -NaCl) mM, no significó una recuperación en la inhibición del crecimiento en todas las accesiones, sólo en las mortalmente intoxicadas (Tabla R9 y Figura R24). Es más, las ratios Na^+/K^+ en 15-45 (KCl -NaCl) mM tenían unos valores menores que las ratios en 1-30 (KCl -NaCl) mM, sin embargo, las accesiones en 15-45 (KCl -NaCl) mM no recuperaron el tamaño de 1-30 (KCl -NaCl) mM (Tabla R9 y Figura R23).

Tabla R9. Ratios internas Na^+/K^+ de raíces, rosetas e inflorescencias de las distintas accesiones de *Arabidopsis* representadas en la Figura R23. ^a Las plantas Ak-1, C24 y Fei-0 en 1-60 no sobrevivieron a dos semanas de tratamiento por lo que no se representan las ratios. Se representan medias y SD de 6 plantas.

Accesión	1 mM K^+ - 30 mM Na^+			1 mM K^+ - 60 mM Na^+			15 mM K^+ - 45 mM Na^+		
	Raíz	Roseta	Inflorescencia	Raíz	Roseta	Inflorescencia	Raíz	Roseta	Inflorescencia
Ak-1	0,62±0,04	4,9±0,4	0,7±0,1		muerta		0,66±0,06	2,8±0,2	0,6±0,1
C24	0,09±0,007	7,9±0,3	No florece		muerta		0,09±0,002	3,0±0,4	No florece
Fei-0	0,22±0,013	6,9±0,4	No florece		muerta		0,22±0,02	2,4±0,2	No florece
Ler	0,31±0,02	7,9±1,1	1,3±0,1	0,65±0,1	11,8±0,9	1,5±0,01	0,27±0,02	0,91±0,14	0,36±0,06
Tsu-1	0,22±0,02	3,2±0,4	No florece	0,34±0,01	5,1±0,9	No florece	0,15±0,01	0,95±0,14	No florece
L1-0	0,36±0,03	3,3±0,5	No florece	0,51±0,06	5,9±0,8	No florece	0,24±0,03	0,54±0,05	No florece
Sha	0,59±0,04	2,1±0,3	0,49±0,11	1,38±0,07	4,1±0,5	0,8±0,08	0,36±0,01	0,56±0,05	0,20±0,03

Estos datos sugieren que, existe un efecto significativo de toxicidad de Na^+ sobre las hojas en algunas accesiones de *Arabidopsis* como Ak-1 ó C24 que conlleva inhibición del crecimiento y muerte de la planta. Sin embargo, el NaCl parece inhibir el crecimiento por un mecanismo que no está asociado a la toxicidad en las hojas y que es independiente de la ratio Na^+/K^+ y de la actividad de HKT1 ya que accesiones que comparten un HKT1 hipomórfico presentan una sensibilidad al sodio muy diferente.

Como ya se ha explicado, también ensayamos el ajuste osmótico en salinidad moderada (1 mM KCl - 60 mM NaCl), midiendo la ratio peso fresco /peso seco después de una semana en Na^+ cuando ninguna de las accesiones había florecido y aún no había signos importantes de toxicidad visible. Los resultados mostraron ratios semejantes a los ya encontrados para Col-0, Ts-1 (Figura R20A), lo cual sugiere que el ajuste osmótico observado en Col-0 y Ts-1 se extiende a todas las accesiones analizadas.

3.2.2.2 Relación de la función HKT1 y la toxicidad del Na^+

Los datos anteriormente expuestos, reflejan la diversidad que existe entre las accesiones de *Arabidopsis* tanto en términos de distribución de Na^+ entre la raíz y parte aérea como en sensibilidad al NaCl. Además, el hecho de que la actividad de HKT1 no correlacionara con ese fenotipo de intoxicación nos llevó a tratar de profundizar en por qué el sodio resultaba tóxico para algunas accesiones y no para otras. Por ello, iniciamos un estudio en colaboración con la Dra. Ronda Meyer, del Abteilung Molekulare Genetik (IPK Gatersleben, Alemania), cuyo laboratorio había generado multitud de líneas RILs

(recombinant inbred lines) procedente de las líneas de interés que habíamos fijado en base a la actividad del gen *HKT*, Col-0 y C24 (en las dos direcciones parentales). Estas líneas diferían en el grado de función del gen *HKT1* que portaban, Col-0 hipermórfico o C24 hipomórfico, de modo que se conocía el gen *HKT1* de cada una de las líneas.

Plantas de las líneas RILs, se transfirieron a condiciones control y a 1 mM K⁺ con 60 mM Na⁺. Tras dos semanas de tratamiento, algunas líneas presentaron daños por toxicidad de Na⁺ en las hojas que resultaron ser independientes del gen *HKT1* que portaban (Figura R25; *HKT1* hipermórfico procedente de Col-0 encuadrado en línea azul; *HKT1* hipomórfico procedente de C24 encuadrado en línea roja). En todos los casos, los signos de toxicidad por Na⁺ llevaron asociados ratios Na⁺/K⁺ que eran bastante altos (Tabla R10; recordamos que el umbral tóxico para las rosetas en plantas *hkt1-4* es ≈ 1.0 , Tabla 4, pero en Ts-1 es > 9.0 , Tabla 5).

Figura R25. Relación de la función de *HKT1* y la toxicidad del Na⁺. Líneas RILs de cuatro semanas procedentes de parentales Col-0 y C24 fotografiadas tras dos semanas de exposición a 1 mM KCl-60 mM NaCl. Los daños por toxicidad de Na⁺ son independientes de la función de *HKT1*. (*HKT1* hipermórfico procedente de Col-0 encuadrado en línea azul; *HKT1* hipomórfico procedente de C24 encuadrado en línea roja)

Tabla R10. Ratios molares Na^+/K^+ de plantas de líneas de RILs, expuestas dos semanas a 1-60 mM KCl-NaCl. Se representan medias y SD de 6 plantas.

RILs	1 mM K^+ - 60 mM Na^+			Genotipo <i>HKT1</i>	Signo de toxicidad
	Raíz	Roseta	Inflorescencia		
Q080	0,41±0,06	50,48±2,9	7,2±1,2	C24	Si+++
Q181	0,73±0,04	11,41±3,2	0,5±0,2	Col-0	Si++
Q108	0,82±0,07	6,01±0,92	0,57±0,13	Col-0	Si+
Q053	0,32±0,04	49,1±1,6	8,22±0,52	C24	Si+++
R075	0,36±0,05	18,2±1,8	3,11±1	C24	Si++
R041	1,24±0,06	10±2,4	0,94±0,26	Col-0	Si++

Los estudios de fenotipado en sal de 32 de las 200 líneas RILs disponibles demuestran con rotundidad, que, aunque *HKT1* sea uno de los transportadores principales implicados en la distribución de Na^+ en la planta de *Arabidopsis*, no es el responsable de la sensibilidad a la toxicidad por Na^+ .

3.3 Análisis funcional y genético de la entrada de Na^+ en *Arabidopsis*

3.3.1 Caracterización fisiológica de la entrada de Na^+ en *Arabidopsis*

3.3.1.1 *Dependencia de nitrato en la acumulación de Na^+ en la parte aérea de plantas hkt1*

Otro aspecto crucial relativo al papel del Na^+ en las plantas es cómo se produce su entrada por la raíz. Tras décadas de estudio en el ámbito del estrés salino aún no hay una respuesta clara a la pregunta de por qué vía entra el sodio en la planta y cuáles son los mecanismos moleculares que permiten esta entrada. Se ha sugerido que el Na^+ entra en la planta vía transporte apoplástico (Yeo et al., 1987; Yadav et al., 1996), vía canales iónicos (Davenport and Tester, 2000; Maathuis, 2014), también vía transportadores específicos (Garcíadeblás et al., 2003)

En nuestro intento por caracterizar de una manera fisiológica el transporte y la acumulación de Na^+ en *Arabidopsis*, no podíamos dejar de lado un capítulo tan importante y aún tan desconocido como los mecanismos que permiten la entrada de Na^+ en la planta.

Para la consecución de este objetivo modificamos ligeramente el protocolo de ensayo (ver Materiales y Métodos sección 2.5.2) y se utilizó el mutante *hkt1*. Como ya se ha mencionado anteriormente, HKT1 está implicado en la retirada del Na^+ desde el xilema hacia las células del parénquima xilemático (Rus et al., 2004), de manera que el mutante *hkt1-4* tiene la peculiaridad de acumular en la parte aérea prácticamente todo el Na^+ que entra en la raíz (Figura R9; Tablas R3 y R4). Por ello, este mutante constituía un sistema experimental más sencillo para poder realizar estudios cinéticos de entrada de Na^+ en la planta.

Las plantas *hkt1-4* crecidas durante 3 semanas sin Na^+ , se transfirieron a la misma solución de crecimiento suplementada con distintas cantidades de NaCl. Tras dos y cuatro horas en este medio de ensayo, se tomaron muestras de la parte aérea (rosetas) y se midieron los contenidos de Na^+ y K^+ . En los tiempos de ensayo de estos experimentos, el contenido de K^+ en la roseta no variaba por lo que la determinación de la ratio Na^+/K^+ era el procedimiento más preciso para determinar el contenido en Na^+ de las rosetas de las plantas *hkt1*. Los primeros resultados mostraron una tendencia lineal en la acumulación de Na^+ en la roseta (Figura R26A). Adicionalmente, en dos de las concentraciones externas de NaCl, 5 y 20 mM NaCl, se tomaron muestras adicionales a 7 horas. Los resultados mostraron de nuevo una tendendia lineal en la acumulación de Na^+ con el tiempo que recordaba a una cinética de primer orden (Figura R26B).

Figura R26. Entrada y acumulación de Na^+ . A, ratios molares Na^+/K^+ en rosetas de plantas *hkt1-4* de tres semanas de edad expuestas durante 2 h (triángulos) y 4 h (cuadrados) a medio hidropónico de crecimiento suplementado con concentraciones crecientes de NaCl. B, ratios molares Na^+/K^+ en rosetas de plantas *hkt1-4* de tres semanas de edad expuestas durante 7 h a medio hidropónico de crecimiento suplementado con 5 mM NaCl (triángulos) y 20 mM NaCl (cuadrados). Se representan medias y SD de 8 plantas.

Para simplificar nuestro sistema experimental aún más y ganar control sobre los iones presentes en el ensayo cinético diseñamos un nuevo medio de ensayo más simple (ver Materiales y Métodos sección 2.3.4.2), a base de 5 mM MES- Ca^{2+} suplementado con una concentración de Na^+ de 40 mM en forma de (Na/MES) y en forma de NaCl (cabe recordar que Na/MES no permitía la adaptación osmótica de Arabidopsis). Sorprendentemente, comparando la acumulación de Na^+ en estas condiciones con los resultados obtenidos con medio hidropónico suplementado con 40 mM NaCl, observamos un descenso en la acumulación de Na^+ en las plantas en Na/MES. Es decir, estaba entrando menos Na^+ en la planta cuando simplificábamos el medio de ensayo (Figura R27A). Por tanto, algo en la solución de medio hidropónico estimulaba la entrada de Na^+ en la planta.

Para identificar el componente presente en el medio hidropónico que estimulaba la entrada de Na^+ , agregamos al medio de ensayo simplificado (tampón MES- Ca^{2+}) los componentes del medio hidropónico. En primer lugar, ensayamos macronutrientes frente a micronutrientes y encontramos que era un macronutriente lo que estimulaba la acumulación de Na^+ en la parte aérea (Figura R27B). Seguidamente, analizamos el efecto de cada uno de los macronutrientes por separado sobre la acumulación de Na^+ . Se ensayaron nitrato, fosfato y sulfato junto con cloruro manteniendo el Na^+ a una concentración de 20 mM. Cualquiera de estos aniones estimulaba la acumulación de Na^+ en la roseta, pero cuando el Na^+ se añadía en combinación con el nitrato, se triplicaba el efecto de los demás aniones y se recuperaban los niveles de entrada de Na^+ que observábamos en nuestros ensayos con medio hidropónico (Figura R27C). Esto sugería que, el nitrato podía ser el principal anión implicado en la entrada de Na^+ en Arabidopsis. A continuación, se ensayó la acumulación de Na^+ en plantas *hkt1-4* expuestas a una concentración de Na^+ constante de 20 mM y concentraciones crecientes de nitrato desde 0.5 a 20 mM, utilizando mezclas de diferentes cantidades de NaNO_3 y Na/MES (ver Materiales y Métodos). En estas condiciones, los contenidos en la raíz apenas se vieron afectados por el aumento creciente de nitrato, como era de esperar en plantas *hkt1* (Figura R28A), sin embargo, encontramos un incremento progresivo en los contenidos de Na^+ de la parte aérea (Figura R28B y R28D).

Figura R27. Estimulación de la entrada de Na⁺ en plantas *hkt1-4* de tres semanas de edad. A, Comparación en la acumulación de Na⁺ en presencia de medio hidropónico de crecimiento suplementado con 40 mM NaCl respecto a plantas expuestas a un medio tampón MES-Ca²⁺ suplementado con Na/MES o con NaCl ambos a una concentración de 40 mM Na⁺ durante 2 y 4 h de ensayo. B, Efecto de macronutrientes y micronutrientes sobre la entrada de Na⁺ tampón MES-Ca²⁺ suplementado con 20 mM NaCl durante 2 y 4 h de ensayo. C, Efecto en la entrada de Na⁺ a 4 h de los distintos aniones que componen el medio nutritivo. Tampón MES-Ca²⁺ suplementado con cada uno de los macronutrientes en forma de sal sódica a una concentración de 20 mM Na⁺.

Figura R28. Efecto del nitrato sobre la acumulación de Na^+ en plantas *hkt1-4* de tres semanas de edad. Ratios Na^+/K^+ en la raíz (A) y la parte aérea (B) de plantas *hkt1-4* expuestas a una concentración de Na^+ constante de 20 mM y a concentraciones crecientes de nitrato desde 0.5 a 20 mM durante 4 h. La concentración de nitrato se obtuvo utilizando mezclas de NaNO_3 y Na/MES . Se representan medias y SD de 8 plantas. Letras diferentes indican que las diferencias son estadísticamente significativas. One-way ANOVA y Tukey's HSD test; $p < 0.01$. C, Dependencia de la concentración de nitrato en la acumulación de Na^+ en la parte aérea de plantas *hkt1-4* en 4 h. Los datos se obtuvieron al sustraer la acumulación de Na^+ a una concentración de nitrato igual a cero (20 mM Na/MES) de la acumulación a diferentes concentraciones de nitrato en el panel D.

Asumiendo que la acumulación de Na^+ producida en 20 mM Na/MES es independiente del nitrato, se substrajo el valor de la acumulación de Na^+ en ausencia de nitrato a los valores obtenidos en las diferentes concentraciones de nitrato. La acumulación de Na^+ nitrato-dependiente resultante seguían una cinética hipenbólica tipo Michaelis-Menten

con unas constantes cinéticas de $K_m \approx 2.5 \text{ mM NO}_3$ y $V_{\max} \approx 36 \text{ nmol h}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Figura R28C). Esta cinética de saturación sugería la existencia de un transportador.

Para confirmar el efecto específico del nitrato sobre la entrada de Na^+ comparamos la acumulación de Na^+ a las 4 horas de ensayo en presencia de nitrato y nitrito Na^+ (ambos en combinación con cloruro sódico para asegurar una entrada basal mínima). Se observó la especificidad del nitrato frente a nitrito (Figura R29A). Además, dado que el clorato es un análogo del nitrato (Doddema et al., 1978), utilizamos también este anión para confirmar la estimulación en la entrada de Na^+ . En este caso se realizó un ensayo de dos horas para reducir la probabilidad de efectos tóxicos por parte del clorato y se analizó el efecto sobre la entrada de sodio en presencia de 20 mM NaCl, tanto de 1,4 mM KNO_3 (la mitad de la concentración de nitrato en el medio de cultivo) como 1,4 mM KClO_3 . Con 1,4 mM nitrato, se consiguió una estimulación del orden del 60% en la acumulación de Na^+ . En presencia de 1,4 mM clorato, la acumulación de Na^+ era menor que con nitrato, pero estaba también estimulada respecto a la que se obtuvo con el medio basal NaCl (Figura R29B). Esto sugería que quizás un transportador de nitrato transportaba Na^+ .

Numerosos trabajos sugieren que la entrada de Na^+ en las plantas se inhibe por Ca^{2+} (Amtmann et al., 1999; Kronzucker and Britto, 2011). Por ello, se analizó el efecto de la concentración de Ca^{2+} en la acumulación de Na^+ en 20 mM Na/MES y 20 mM NaNO_3 (Ver Materiales y Métodos, sección 2.5.2), añadiendo concentraciones crecientes de Ca^{2+} , de 0,125, 1,25 (esta es la concentración normal en nuestros experimentos) y 10 mM. Un aumento de 80 veces la concentración de Ca^{2+} (de 0,125 a 10 mM) redujo la acumulación de Na^+ en la parte aérea un 60%, en el caso de NaNO_3 y un 40% en el caso de Na/MES (Figura R30).

Figura R29. Acumulación de Na^+ en presencia de otros aniones relacionados con el nitrato. Se determinaron los ratios Na^+/K^+ en parte aérea de plantas *hkt1-4* de tres semanas de edad expuestas a 20 mM Na^+ . A, Efecto de 10 mM NO_3^- y NO_2^- sobre 10 mM NaCl en 4 h de ensayo. B, Efecto de 1.4 mM NO_3^- y ClO_3^- en 2 h de ensayo. El medio basal en (B) está suplementado con 20 mM NaCl. Se representan medias y SD de 8 plantas.

Figura R30. Dependencia de la concentración de Ca^{2+} en la acumulación de Na^+ en la parte aérea de plantas *hkt1-4* a 20 mM Na^+ durante 4 h de ensayo. El medio contiene 20 mM NaNO_3 ó 20 mM Na/MES suplementados a distintas concentraciones de MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH 6,15. Se representan medias y SD de 8 plantas.

3.3.1.2 Efecto del nitrato en la toma de Na^+ por la raíz y la carga de Na^+ al xilema

Todo el Na^+ que se acumula en la planta, en raíz y roseta, entra por la raíz. Así, el incremento en la acumulación de Na^+ en plantas *hkt1* expuestas a una concentración de Na^+ constante y con concentraciones crecientes de nitrato (Figura R28) indicó que el nitrato estimulaba la velocidad de entrada de Na^+ en la raíz. De igual manera, todo el Na^+ acumulado en la parte aérea de la planta tiene que ser previamente cargado al xilema y en las plantas *hkt1*, la acumulación de Na^+ en la parte aérea en función de la concentración externa de nitrato, ocurrió sin que hubiera cambios notables en el contenido en Na^+ de la raíz (Figura R28). Esto indicaba que el nitrato también estimulaba la carga de Na^+ al xilema.

Para investigar el efecto de concentraciones de Na^+ más altas que 20 mM, suplementamos 20 mM Na/MES ó 20 mM NaNO_3 con 40 mM Na/MES (de esta manera aumentábamos la concentración de Na^+ pero no la de nitrato) y medimos la acumulación de Na^+ en la raíz y la parte aérea. Se comprobó que, tanto para MES como para nitrato, un incremento en la concentración de Na^+ externo incrementaba la acumulación de Na^+ en ambos tejidos (Figura R31A y R31B). Además, se corroboró que la presencia de nitrato aumentaba tanto la absorción como la translocación de Na^+ al xilema (Figura R31C)

Figura R31. Efecto del aumento en la concentración de Na⁺ externo sobre la acumulación de Na⁺ en raíz (A) y en parte aérea (B). A los medios estándares de 20 mM Na/MES o NaNO₃ (ambos en 5 mM MES-Ca(OH)₂ pH 6,15) se añade 40 mM Na/MES. C, representación de Na⁺ absorbido por la raíz (Na⁺ total/ PS raíz) y Na⁺ translocado al xilema (Na⁺ parte aérea/PS raíz). Se representan medias y SD de 8 plantas.

3.3.1.3 Interrelación entre SOS1 y nitrato en la carga de Na⁺ al xilema

Como ya se mencionó con anterioridad, el antiportador Na⁺/H⁺ SOS1 media tanto la salida de Na⁺ de la raíz al exterior (Zhu, 2003) como la carga al xilema (Shi et al., 2002). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la carga de Na⁺ al xilema sería consecuencia de al menos dos procesos, uno mediado por SOS1 y otro dependiente de nitrato. Para investigar sobre la relación entre estos dos procesos, medimos la acumulación de Na⁺ en raíces y partes aéreas de plantas *SOS1* y *sos1* en ausencia y presencia de nitrato. Decidimos utilizar también en estos ensayos plantas tanto *HKT1* como *hkt1* con el objetivo de disponer de resultados a dos niveles de contenido de Na⁺ en la raíz, más alto en plantas *HKT1* que en plantas *hkt1*. De los resultados obtenidos al comparar las plantas en Na⁺/MES con las plantas en NaNO₃ pudimos sacar tres conclusiones (Figura R32 y Tabla R11)

Figura R32. Acumulación de Na^+ en la raíz y transferencia de Na^+ a la parte aérea. Plantas de cuatro genotipos distintos que varían en los genes *HKT1* y *SOS1*: línea silvestre (*HKT1 SOS1*); mutantes en el gen *HKT1* (*hkt1 SOS1*); mutantes en el gen *SOS1* (*HKT1 sos1*) y dobles mutantes (*hkt1 sos1*) fueron expuestas durante 4 h a un medio tampón MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH 6,15 suplementado con 20 mM Na/MES ó 20 mM NaNO_3 . La transferencia de Na^+ a la parte aérea se calculó como (Na^+ parte aérea / peso seco raíz). Se representan medias y SD de 8 plantas.

Tabla R11. Toma y transferencia de Na^+ a la parte aérea en plantas silvestres (*HKT1 SOS1*); mutantes en el gen *HKT1* (*hkt1 SOS1*); mutantes en el gen *SOS1* (*HKT1 sos1*) y dobles mutantes (*hkt1 sos1*) tras 4 h en 20 mM Na/MES ó NaNO_3 . Se determinaron valores de peso seco, y contenidos en Na^+ y K^+ .

Línea	Raíz			Parte Aérea		
	PS (mg)	K^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/PS (nmol mg^{-1})	PS (mg)	K^+/PS (nmol mg^{-1})	Na^+/PS (nmol mg^{-1})
0 h en Na^+						
<i>HKT1 SOS1</i>	3,5±0,4	1463±253	6,0±1,1	21,3±1,5	987±109	2,6±0,4
<i>hkt1 sos1</i>	4,9±0,6	1506±174	4,9±0,3	26,9±2,0	961±25	1,8±0,3
<i>HKT1 sos1</i>	3,9±0,4	1658±174	7,1±1,4	22,4±1,1	924±56	2,5±0,6
<i>hkt1 SOS1</i>	3,4±0,9	1645±99	7,7±0,7	24,7±3,6	906±68	2,1±0,3
4 h en Na/MES						
<i>HKT1 SOS1</i>	4,4±0,4	1452±117	74,8±10,2	28,9±2,7	863±31	10,8±2,1
<i>hkt1 sos1</i>	5,8±0,9	1357±103	89,8±7,1	32,8±5,2	904±50	28,4±4,1
<i>HKT1 sos1</i>	5,2±1,0	1465±276	216,2±25,0	25,7±3,3	948±58	14,2±9,4
<i>hkt1 SOS1</i>	4,4±0,6	1614±205	50,5±6,7	26,6±4,1	899±35	32,8±2,7
4 h en NaNO_3						
<i>HKT1 SOS1</i>	4,4±0,7	1507±292	95,7±8,0	29,4±3,3	933±43	67,6±13,6
<i>hkt1 sos1</i>	6,3±1,6	1253±55	93,6±6,7	32,1±6,2	962±52	110,9±17,3
<i>HKT1 sos1</i>	4,4±0,7	1429±118	223,4±14,8	27,4±4,1	977±107	56,1±6,9
<i>hkt1 SOS1</i>	4,5±0,6	1505±144	43,4±7,9	27,0±3,5	924±55	123,6±22,1

(i) Cuando comparamos plantas del mismo genotipo, era evidente que la presencia de nitrato incrementaba la captación de Na^+ . Así, el contenido total de Na^+ acumulado en la planta fue siempre mayor en NaNO_3 que en Na/MES .

(ii) La presencia de nitrato incrementó también la carga de Na^+ en el xilema ya que la mayor parte del Na^+ acumulado en las plantas tratadas con NaNO_3 se acumuló en la parte aérea sin que se observara un incremento significativo del contenido en Na^+ de la raíz.

(iii) Se corroboró que *SOS1* mediaba la carga de Na^+ al xilema ya que, en ausencia de nitrato, *SOS1* incrementó la cantidad de Na^+ transferido a la parte aérea (comparamos plantas *hkt1 sos1* and *hkt1 SOS1* en Na/MES ; las diferencias entre las medias fueron estadísticamente significativas con un $P < 0,01$; esta comparación no puede realizarse con plantas *HKT1* porque la expresión del gen *HKT1* en plantas *sos1* y *SOS1* podría diferir, (Oh et al., 2010).

3.3.1.4 Variabilidad natural en la entrada de Na^+

Los resultados arriba mencionados corroboran el hecho de que existe una estimulación de la entrada de Na^+ mediada por nitrato que, además, no es dependiente del genotipo *hkt1* ya que plantas *HKT1 SOS1* (plantas *g1Col-0*) mostraron el mismo patrón de mayor acumulación de Na^+ en presencia de nitrato. Ante la posibilidad de que Col-0 fuese una excepción, ensayamos la entrada de Na^+ en Na/MES y NaNO_3 en las accesiones *Ler*, *C-24*, *Ts-1* y *Ws*, llevando de control Col-0.

Los resultados indicaron que, igual que ocurría en Col-0, las partes aéreas de las demás accesiones ensayadas mostraban siempre una mayor acumulación de Na^+ en NaNO_3 que en Na/MES (Figura R33B). Además, cuando analizamos la acumulación de Na^+ que específicamente dependía de nitrato, sustrayendo la entrada en Na/MES de la de NaNO_3 (Figura R33C), observamos diferencias muy significativas, especialmente entre *C24* y *Ws*. Estos resultados sugieren que, al igual que ocurre con la acumulación de Na^+ a tiempos largos, en *Arabidopsis* existe una importante variabilidad natural en la entrada de Na^+ , tanto dependiente como independiente de nitrato.

Figura R33. Dependencia del nitrato en la acumulación de Na^+ en cinco accesiones distintas de *Arabidopsis*: Col-0, Ler, C24, Ts-1 y Ws. A, Acumulación de Na^+ en raíz. B, Acumulación de Na^+ en la parte aérea. Las accesiones se ensayaron durante 4 h en un medio a base de 5 mM MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH 6,15 suplementado con 20 mM Na/MES o 20 mM NaNO_3 . Los contenidos en Na^+ se expresan como ratios molares Na^+/K^+ ; los contenidos de K^+ para cualquier accession fueron semejantes en ambos tratamientos. Se representan medias y SD de 8 plantas. C, Incremento en la acumulación de Na^+ . One-way ANOVA y Tukey's HSD test; $p < 0.05$.

3.3.1.5 Papel de NRT1.1 en el transporte de Na^+ dependiente de nitrato

La hipótesis más sencilla para explicar la toma y carga de Na^+ al xilema dependiente de nitrato descrita anteriormente es que dichos flujos transmembranas estuvieran mediados por uno o varios transportadores de nitrato. En *Arabidopsis* hay más de 50 genes que determinan probables transportadores de nitrato, los cuales se clasifican en transportadores de alta y baja afinidad (HATS and LATS, respectivamnete). A partir de los datos cinéticos que habíamos obtenido (Figura R28), seleccionamos los dos transportadores LATS NRT1.1 (CHL1) y NRT1.2 (NTL1) y estudiamos su participación en la toma de Na^+ por la raíz (Krouk et al., 2010; Wang et al., 2012; Krapp et al., 2014; O'Brien et al., 2016)

Figura R34. Efecto de las mutaciones *nrt1.1* y *nrt1.2* en la acumulación de Na^+ en raíz y parte aérea. Acumulación de Na^+ en plantas *nrt1.1 (chl1-5)*, *nrt1.2 (ntl1)* y sus respectivos fondos genéticos Col-0, expuestas 4 h a un medio a base de 5 mM MES–Ca(OH)₂ pH 6,15 suplementado con 20 mM Na/MES o 20 mM NaNO₃. Se representan medias y SD de 16 plantas para el *nrt1.1* y 6 plantas para el *nrt1.2*. Las diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de Na^+ entre el fondo genético silvestre y la planta mutante se determinaron por un Student's t-test. * 0.01 < P < 0.1; **P < 0.0001.

Para ello ensayamos la entrada de Na^+ en 20 mM NaNO₃ y Na/MES en dos mutantes bien caracterizados *chl1-5 (nrt1.1)* and *ntl1 (nrt1.2)* comparándolos con sus correspondientes fondos genéticos silvestres, Col-0 (Figura R34). En Na/MES (ausencia de nitrato) ninguna de las dos mutaciones parecía afectar al contenido en Na^+ de la raíz o de la parte aérea. En NaNO₃, la mutación *ntl1* no modificaba el contenido en Na^+ de la parte aérea e incluso incrementaba un poco el contenido de la raíces. Sin embargo, las plantas *chl1-5* en nitrato mostraban un descenso en el contenido de Na^+ muy significativo (P < 0,0001) de un 30% en la raíz y de un 25% en la parte aérea. Para corroborar este resultado repetimos los ensayos utilizando otros mutantes para el gen *NRT1.1* (N201) en fondo

genético Ler y para el gen *NRT1.2* (N673899) en fondo genético Col-0, obteniendo una respuesta similar (Figura R35). Dado que se ha descrito que NRT1.1 tiene un doble papel como transportador de nitrato y como sensor del nivel de nitrato en la planta, nuestros resultados sugieren que NRT1.1 o bien media parcialmente o modula el transporte de Na^+ dependiente de nitrato.

Figura R35. Efecto de las mutaciones *nrt1.1* y *nrt1.2* en la acumulación de Na^+ en raíz y parte aérea. Acumulación de Na^+ en plantas *nrt1.1* (N201), *nrt1.2* (N673899) y sus respectivos fondos genéticos Ler y Col-0, expuestas 4 h a un medio a base de 5 mM MES– $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH 6,15 suplementado con 20 mM Na/MES o 20 mM NaNO_3 . Se representan medias y SD de 8 plantas. Las diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de Na^+ entre el fondo genético silvestre y la planta mutante se determinaron por un Student's t-test. * $0.01 < P < 0.1$; ** $P < 0.0005$.

3.3.1.6 Identificación de posibles transportadores de Na^+ y nitrato en *Arabidopsis*

El papel parcial de NRT1.1 en el transporte de Na^+ o como regulador del transporte de Na^+ , sugería que otro transportador de nitrato transportaba Na^+ . Para intentar identificarlo hicimos un estudio de secuencias partiendo de la hipótesis de que un transportador Na^+ /nitrato tenía que existir en los organismos marinos ya que en un medio salino con un pH alrededor de 8.3 y baja concentración de nitrato solo un simporte nitrato/ Na^+ puede cubrir los requerimientos de nitrato y la existencia de un simporte nitrato/ H^+ sería

probablemente deletéreo. La presencia de un simporte de este tipo descrito para *Zostera marina* (García-Sánchez et al., 2000) corroboraba esta hipótesis. La base de la búsqueda de un simporte nitrato/ Na^+ consistió en identificar alguna secuencia conservada dentro de los transportadores de nitrato en organismos marinos o de medios salinos, desde arqueas a eucariotas. Después de estudiar un gran número de secuencias, se identificó una región moderadamente conservada donde se localizan una serie de residuos muy bien conservados destacando, una fenilalanina totalmente conservada (la Tabla R12 resume estos resultados con una variedad de ejemplos). Cuando la búsqueda de homología se extendió a los transportadores de nitrato en las plantas terrestres, en todas las plantas secuenciadas encontramos un transportador en el que existía la fenilalanina característica de los transportadores de nitrato de la vida marina. Como excepción, la remolacha tiene dos de estos transportadores. En *Arabidopsis*, NRT2.5 es el único transportador de nitrato que mantiene la fenilalanina característica de los organismos marinos.

Tabla R12. Identificación de una region moderadamente conservada entre homólogos de genes que determinan transportadores de nitrato en organismos de vida marina. Se identificaron residuos muy bien conservados entre los que destaca una fenilalanina (F). Identificación del transportador NRT2.5 de *Arabidopsis thaliana* como portador de la secuencia que caracterizaría a los putativos simportadores $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$

Organismos de vida marina		
Ostreococcus	YGACFGVELTMNNIVAGYLFDRF	Clorofita marina
Micromonas	YGFCFGVELTMNNIVAGYLFDRF	Clorofita marina
Dunaliella	YGYCFGVELTINNIIIVAYMFDQF	Clorofita marina
Kushneria	YAACFGVELTINNIAALYYFDNF	γ -proteobacteria salina
Thalassospira	YGACFGVELTINNIAAIYFFDRF	α -proteobacteria salina
Chondrus	YAGCFGVELLMNQNLATYFQEQF	Rodofita salina
Dactylococcopsis	YVTNFGSELAVVSMLPAFFEVT	Cianobacteria salina
Halopiger	YVMTFGLLEAMNGWLGTYRKG	Arquea, halobacteria
Zostera marina	YGYCFGVELTVNNVIAEYFFDRF	Planta marina
Plantas terrestres		
<i>Aegilops tauschii</i>	YGYCFGVELAVDNIVAQYFYDRF	
	YGYCMGVELTTDNVIAEYFDHF	
<i>Hordeum vulgare</i>	YGYSFGVELAVDNIVAQYFYDRF	
	YGYCMGVELTTDNVIAEYFDHF	
<i>Gossypium hirsutum</i>	YGYCFGVELTVDNIIAEYFYDRF	
	YGYSMGVELSTDNVIAEYFFDRF	
<i>Beta vulgaris</i>	YGYCFGVELTVDNIIAQYFYDRF	
	YGYCFGVELTVDNIIAQYFYDRF	
<i>Eutrema salsugineum</i>	YGYCFGVELTIDNIIAEYFFDRF	
	YGYSMGVELTTDNVIAEYFFDRF	
<i>Arabidopsis salsugineum</i>	YGYCFGVELTIDNIIAEYFFDRF	
	YGYSMGVELTTDNVIAEYFFDRF	
<i>Arabidopsis thaliana</i>		
At NRT2.5	YGYCFGVELTIDNIIAEYFFDRF	
At NRT2.4	YGYSMGVELTTDNVIAEYFFDRF	
At NRT2.1	YGYSMGVELSTDNVIAEYFFDRF	

De acuerdo con la hipótesis original y los resultados de las búsquedas realizadas, NRT2.5 era probablemente un simportador nitrato/ Na^+ y un buen candidato de ser el mediador del transporte de Na^+ dependiente de nitrato que habíamos descrito. Por ello, se obtuvieron semillas del mutante *nrt2.5* para ensayarlas en nuestras condiciones y determinar si se trataba de nuestro gen. Los resultados obtenidos mostraron que el mutante *nrt2.5* se comportó como el control Col-0 en términos de acumulación de Na^+ por lo que no parece ser el transportador que buscamos (Figura R36).

Figura R36. Efecto de la mutación *nrt2.5* en la acumulación de Na^+ en raíz y parte aérea. Acumulación de Na^+ en plantas *nrt2.5*, junto a su respectivo fondo genético Col-0, expuestas 4 h a un medio a base de 5 mM MES- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH 6,15 suplementado con 20 mM Na/MES o 20 mM NaNO_3 . El panel superior representa las concentraciones internas de Na^+ y el panel inferior las ratios molares Na^+/K^+ . Se representan medias y SD de 6 plantas

3.3.2 Búsqueda de sistemas de entrada de Na^+ en la planta a través del análisis de la expresión génica

3.3.2.1 Análisis transcriptómico durante la entrada de Na^+

Los resultados descritos hasta ahora indicaban la existencia de una entrada de Na^+ minoritaria (alrededor del 30%), que era independiente de la presencia de nitrato o de cualquier otro anión, como sulfato, fosfato y cloruro y otra entrada, mayoritaria (alrededor del 70%), dependiente de nitrato. Con el objetivo de indentificar los transportadores implicados en ambas vías de entrada y acumulación de Na^+ , una hipótesis razonable era que dichos sistemas de transporte pudieran estar regulados transcripcionalmente. Atendiendo a esta hipótesis, realizamos un análisis transcriptómico de la respuesta de la planta en las condiciones de entrada de Na^+ previamente ensayadas. Para ello, decidimos utilizar la accesión Col-0 y realizamos un ensayo típico donde plantas crecidas durante cuatro semanas en medio hidropónico se transfirieron a tres medios de ensayo diferentes; Control (tampón 5 mM MES- Ca^{2+} sin Na^+ y sin nitrato); Na/MES (tampón 5 mM MES- Ca^{2+} suplementado con 20 mM Na^+ /MES) y NaNO_3 (tampón 5 mM MES- Ca^{2+} suplementado con 20 mM NaNO_3). A las cuatro horas se recogieron muestras de raíces y de partes aéreas para evaluar contenidos en Na^+ y K^+ , y muestras de raíces para la extracción de RNA (Figura R37). Los resultados de contenidos en Na^+ referido a K^+ (Figura R38A) o a peso seco (Figura R38B), permitieron confirmar en el ensayo, una entrada de Na^+ independiente de nitrato y otra, mayoritaria, dependiente de nitrato similar a la descrita previamente. Este ensayo se realizó por triplicado y las muestras de RNA de raíces se mandaron a secuenciar al BGI (Beijing Genomic Institute), donde se realizó el análisis bioinformático posterior.

Figura R37. Dibujo que esquematiza el ensayo que se realizó destinado a la toma de muestras para la extracción de RNA. Plantas Col-0 de cuatro semanas de edad se transfirieron a tres medios de ensayo distintos: **control**, medio tampón sin suplementar; **Na/MES**, medio tampón suplementado con 20 mM Na/MES; Y **NaNO_3** , medio tampón suplementado con 20 mM NaNO_3 . El medio tampón únicamente contiene 5 mM MES- Ca^{2+} a pH 6,15. Transcurridas 4 h, se tomaron muestras de raíces y partes aéreas para contenidos de Na^+ y K^+ y se tomaron muestras de raíces para la extracción de RNA destinado al análisis transcriptómico por RNA Seq.

Figura R38. Acumulación de Na⁺ en raíz y parte aérea de plantas Col-0 expuestas 4 h a tres condiciones de ensayo: control, Na/MES y NaNO₃. A, Ratios Na⁺/K⁺. B, Concentración interna de Na⁺. Se consideró la media de los valores correspondientes a las tres replicas biológicas. Cada replica constó de 6 plantas por condición.

El análisis transcripcional de los triplicados de nuestras muestras revelaron que había en torno a 600/650 genes expresados diferencialmente (GEDs) en cada una de las comparativas entre las condiciones ensayadas (Figura R39). De estos GED, aproximadamente el 50% se inducen y la otra mitad se reprimen en cada comparativa entre condiciones estudiadas, salvo en la comparativa entre NaNO₃vsControl donde un 63% de los genes se reprimen y un 37% se inducen.

Figura R39. Número de genes expresados diferencialmente (GEDs) en las diferentes comparativas entre condiciones. Las barras verdes representan el número de GEDs reprimidos y las barras rojas el número de genes inducidos en las distintas comparativas.

Seguidamente, realizamos un estudio de enriquecimiento de términos de ontología de genes utilizando PANTHER con el objetivo de ver si los genes diferencialmente expresados entre dos condiciones de ensayo podían dar cuenta de un enriquecimiento en algún proceso biológico de relevancia. Llamativamente, la categoría más enriquecida resultó ser el transporte de iones (Figura R40). Esto indicaba que existía una significativa regulación a nivel transcripcional de genes que determinan transportadores o sistemas de transporte de iones, lo cual sugería que este abordaje podría resultar exitoso a la hora de identificar los transportadores que mediaban la entrada de Na^+ en la planta tanto dependiente como independiente de nitrato.

Figura R40. Estudio de enriquecimiento de términos de ontología de genes utilizando la herramienta de clasificación PANTHER. Se analizó la lista de GEDs de cada comparativa entre las distintas condiciones ensayadas frente a la referencia *Arabidopsis thaliana* de la herramienta. Tipo de análisis efectuado: PANTHER Overrepresentation Test. Annotation; Categoría seleccionada: Slim Panther biological process; Tipo de test: Fisher's Exact con FDR corregida.

Para saber cuántos GEDs correspondían a transportadores reconocidos, realizamos una búsqueda de todos los transportadores registrados de Arabidopsis en la base de datos TransportDB 2.0 (<http://www.membranetransport.org/transportDB2/index.html>). En esta base de datos hay registrados un total de 1279 identificadores AGI (Arabidopsis Genome Initiative) correspondientes a sistemas de transporte en esta especie. Así, un total de 57 y 49 genes diferencialmente expresados y que correspondían a sistemas de transporte fueron identificados en los tratamientos de NaNO₃ y Na/MES comparados con el control (Figura R41, Anexo R1), solapando ambos conjuntos en un porcentaje menor al 20%, (Figura R42), lo que indicaba que la respuesta transcriptómica a la sal variaba significativamente en función de la presencia de NO₃⁻. Además, se identificaron 42 GEDs que determinaban transportadores en la comparativa entre los tratamientos de NaNO₃ y Na/MES (Figura R41; Anexo R1).

Figura R41. Número de genes expresados diferencialmente (GEDs) que determinaban sistemas de transporte de Arabidopsis en las diferentes comparativas entre las condiciones ensayadas. Las barras verdes representan el número de GEDs reprimidos y las barras rojas el número de genes inducidos en las distintas comparativas.

A

B

Figura R42. La respuesta transcriptómica a la sal (20 mM Na⁺) varió significativamente en función de la presencia de nitrato. A, Diagrama de Venn que muestra un solapamiento menor al 20% entre el conjunto de GEDs obtenidos en la comparativa entre NaNO₃ frente a control y el conjunto de GEDs obtenidos en la comparativa entre Na/MES frente a control. B, igual que A pero atendiendo exclusivamente a GEDs que determinaban sistemas de transporte. Los GEDs presentes en el conjunto común, correspondían a genes que determinan sistemas de transporte y que modificaban su expresión por Na⁺, once de ellos se reprimían en presencia de Na⁺ (encuadrados en verde). Y cinco de ellos indujeron su expresión específicamente por Na⁺, por lo que en este subconjunto podría encontrarse algún candidato interesante.

3.3.2.1.1 Expresión génica de transportadores de nitrato durante la entrada de Na⁺

Como ya se ha comentado NRT1.1 no puede explicar por sí sólo todo el transporte de Na⁺ dependiente de nitrato, por lo que nos preguntamos si otro transportador de nitrato podría además transportar Na⁺. Así, analizamos la regulación transcriptómica de la familia de transportadores de nitrato y observamos que, de entre más de 50 genes que integran esta familia, un total de 10 genes estaban regulados a nivel transcripcional. Cuando analizamos los GEDs que determinan transportadores de nitrato mediante un agrupamiento jerárquico, identificamos distintos patrones de expresión entre las diversas comparativas entre tratamientos. Las Figuras R43A y R43B muestran los GED que determinan transportadores de nitrato y sus correspondientes niveles de expresión (fold change) en las distintas comparaciones de las condiciones ensayadas. La mayoría de los genes que se expresaron diferencialmente al comparar las condiciones Na/MES frente al control se indujeron, sin embargo, la mayoría de los genes que se expresaron diferencialmente al comparar las condiciones NaNO₃ frente a Na/MES se reprimieron. En la Tabla R14 se recopilan los GEDs correspondientes a transportadores de nitrato y sus respectivos niveles de expresión (fold change) para las diferentes comparaciones de condiciones.

Figura R43. Regulación transcriptómica de la familia de transportadores de nitrato. A, Agrupamiento jerárquico donde se identificaron distintos patrones de expresión entre los GEDs que determinaban transportadores de nitrato en las diversas comparativas entre condiciones ensayadas. B, Número de genes expresados diferencialmente (GEDs) que determinan transportadores de nitrato en las diferentes comparaciones de condiciones de ensayo. Las barras verdes representan el número de GEDs reprimidos y las barras rojas el número de genes inducidos en las distintas comparativas.

Tabla R14. GEDs que determinan transportadores de nitrato en las distintas comparativas entre las condiciones ensayadas. El número indica los correspondientes niveles de expression (Fold change). Signo – y fondo color verde indica represión; sin signo y fondo rosa indica inducción.

AGI	Símbolo	NaNO ₃ vsControl	Na/MESvsControl	NaNO ₃ vsNa/MES
AT1G12940	NRT2.5	-4,46	-0,74	-3,72
AT1G22550	NPF5.16	0,26	1,11	-0,85
AT1G32450	NRT1.5	-1,48	-1,45	-0,03
AT1G72140	NPF5.12	0,80	1,36	-0,56
AT3G45060	NRT2.6	0,39	2,61	-2,23
AT3G45680	NPF2.3	-0,88	0,57	-1,45
AT3G45720	NPF2.1	-0,60	1,48	-2,08
AT3G53960	NPF5.7	0,71	1,37	-0,66
AT4G21680	NRT1.8	1,41	1,43	-0,03
AT5G60770	NRT2.4	-2,10	0,86	-2,95

3.3.2.1.2 Expresión génica de otros sistemas de transporte durante la entrada de Na⁺

Seguidamente analizamos los GEDs que determinaban otros sistemas de transporte distintos de los transportadores de nitrato. Mediante un agrupamiento jerárquico, identificamos distintos patrones de expresión entre las diversas comparaciones de tratamientos (Figura R44). En principio, si la entrada de Na⁺ dependiente de nitrato estuviese regulada a nivel transcripcional, cabría esperar que el transportador responsable de dicha entrada se encontrara entre los GEDs identificados en la comparativa entre los tratamientos de NaNO₃ y Na/MES. Sin embargo, pensamos que no era prudente descartar

otros patrones de expresión ya que, dado que creemos que en determinadas condiciones el Na^+ tiene también un papel como regulador osmótico para la planta, es posible que el gen que buscamos esté regulado positivamente tanto en la comparativas NaNO_3 vsControl como en Na/MES vsControl. Por último, merecía la pena estudiar otros patrones de expresión distintos ya que también estamos interesados en encontrar el transportador que participa en la entrada de Na^+ independiente de nitrato. Por ello, seleccionamos de cada subgrupo de genes unos genes representantes para estudiar (Tabla R15) y se pidieron semillas de algunos mutantes en los genes seleccionados. Tras el genotipado y amplificación de semillas, se ensayaron 10 mutantes en las condiciones de 20 mM Na/MES y 20 mM NaNO_3 (Tabla R15). Se señala con un asterisco rojo todos los genes que hemos podido analizar hasta ahora para la conclusión de este trabajo. Además de los genes que determinan transportadores de nitrato cuyo fenotipo de entrada de Na^+ se ha analizado, el resto de genes analizados, determinan transportadores relacionados con el transporte de nitrato SLAC1 Homologue 2 (SLAH2-3), de sulfato (SULTR1;2 y SULTR3;5) y de K^+ (HAK5 y SKOR). Todos ellos posibles candidatos a mediar el transporte de Na^+ ya sea como simportadores anión/ Na^+ o sustituyendo K^+ por Na^+ .

Tabla R15. GEDs que determinaron sistemas de transporte en las distintas comparativas entre las condiciones ensayadas. El número indica los correspondientes niveles de expresión (Fold change). Signo – y fondo color verde indica represión; sin signo y fondo rosa indica inducción. Letras en mayúscula indican subgrupos de GEDs con patrones de expresión similares (ver Figura R44). Se indica con un asterisco los genes escogidos para su estudio fenotípico.

	AGI	Símbolo	NaNO_3 vsControl	Na/MES vsControl	NaNO_3 vs Na/MES
A	AT1G12940	NRT2.5 *	-4,46	-0,74	-3,72
	AT4G13510	AMT1;1	-1,12	-0,19	-0,93
	AT3G26570	PHT2;1	-1,03	-0,15	-0,88
	AT1G64170	CHX16	-1,61	-0,63	-0,98
	AT4G23700	CHX17	-1,30	-0,40	-0,90
	AT5G41610	CHX18	-1,32	-0,59	-0,73
B	AT5G60770	NRT2.4 *	-2,10	0,86	-2,95
C	AT1G32450	NRT1.5 *	-1,48	-1,45	-0,03
D	AT1G64780	AMT1;2	-0,73	-1,18	0,45
	AT5G24030	SLAH3	-0,53	-1,42	0,89
E	AT4G27970	SLAH2 *	1,04	0,71	0,33
	AT4G21680	NRT1.8 *	1,41	1,43	-0,03
F	AT3G45060	NRT2.6 *	0,39	2,61	-2,23
G	AT4G13420	HAK5 *	1,00	2,65	-1,65
H	AT3G02850	SKOR *	0,67	-1,00	1,67
I	AT1G78000	SULTR1;2 *	1,63	0,17	1,46
	AT5G19600	SULTR3;5 *	2,37	0,81	1,56
	AT2G47160	BOR1	1,10	-0,48	1,58

Figura R44. Agrupamiento jerárquico donde se identificaron distintos patrones de expresión en los genes diferencialmente expresados que determinan sistemas de transporte en Arabidopsis. Aparecen encuadrados y denominados alfabéticamente distintos subgrupos de genes que presentaron un patrón de expresión similar en las diferentes comparaciones de tratamientos. De cada subgrupo se han escogido representantes característicos.

Entre los GED's identificados que determinaron sistemas de transporte, cabe mencionar algunos grupos o familias de transportadores que estaban ampliamente representados como fueron los genes que determinan proteínas MATE (Multidrug and toxic compound extrusion), genes que determinan proteínas UNAMIT (Usually Multiple Acids Move In And Out Transporters), muchas de ellas conocidas como nodulinas y transportadores de aminoácidos. A pesar de que en este trabajo no hemos podido analizar ninguno de estos genes, aparecen expresados diferencialmente en un número significativo (Anexo 1) y no se descarta en un futuro analizar algunos de sus miembros.

3.3.2.2 *Entrada de Na⁺ en mutantes de transportadores de nitrato*

Se estudió la acumulación de Na⁺ en plantas mutantes en los transportadores de nitrato NRT1.8, NRT2.4, NRT2.6 y NRT1.5 junto con sus respectivos fondos genéticos silvestres, expuestos 4 h a 20 mM Na/MES y 20 mM NaNO₃. Los resultados indicaron que ninguno de los transportadores de nitrato ensayados era el responsable de la entrada de Na⁺ mediada por nitrato (Figura R45).

3.3.2.3 *Entrada de Na⁺ en mutantes de otros transportadores*

Se estudió la acumulación de Na⁺ en plantas mutantes en el transportador de nitrato SLAH2-3, en los transportadores de sulfato SULTR1;2 y SULTR3;5 y en el transportador de alta afinidad de K⁺ HAK5, analizados junto con sus respectivos fondos genéticos tras 4 h de ensayo en 20 mM Na/MES y 20 mM NaNO₃. Los resultados mostraron que, ni SLAH2-3 ni los transportadores de sulfato eran los responsables de mediar la entrada de Na⁺ que buscábamos. Sin embargo, si encontramos diferencias significativas entre la acumulación de Na⁺ en la raíz de plantas *hak5* y su control silvestre Col-0 (Figura R46). La menor acumulación de Na⁺ en la raíz de *hak5*, unido a la mayor expresión del gen *HAK5* en la condición Na/MES frente a la condición control (Tabla R15) sugiere que este transportador podría explicar una pequeña parte de la entrada de Na⁺ independiente de nitrato en la raíz (Figura R46).

De los diez mutantes de genes de Arabidopsis a los que se les analizó el fenotipo, el único donde se observó una modificación muy significativa de la distribución de Na⁺ en comparación con la versión silvestre fue en plantas mutantes de SKOR (Stelar K⁺ outward rectifier channel), un canal de K⁺ localizado en las células del parénquima xilemático e implicado en el paso de K⁺ hacia el xilema. En el estudio de entrada y acumulación de Na⁺ de este mutante, y debido a su requerimiento de K⁺, además de los tratamientos de 20 mM Na/MES y 20 mM NaNO₃, se llevaron en paralelo otras dos condiciones de ensayo, 20 mM NaNO₃ + 2 mM KCl y 20 mM NaCl. Además, se muestran los niveles de Na⁺ y K⁺ en plantas *skor* sin tratar (1 mM KCl), para eliminar la posibilidad de una pérdida significativa en los niveles de K⁺ durante los distintos tratamientos (Figura R47).

Figura R45. Efecto de las mutaciones *nrt1.8* (A), *nrt2.4* (B), *nrt2.6* (C) y *nrt1.5* (D), en la acumulación de Na⁺ en raíz y parte aérea. Acumulación de Na⁺ en plantas *nrt1.8*, *nrt2.4*, *nrt2.6* y *nrt1.5* junto a sus respectivos fondos genéticos Ws ó Col-0, expuestas 4 h a un medio a base de 5 mM MES–Ca(OH)₂ pH 6,15 suplementado con 20 mM Na/MES o 20 mM NaNO₃. Se representan medias y SD de 6 plantas.

Figura R46. Efecto de las mutaciones *slah2-3* (A), *sultr1;2* (B), *sultr3;5* (C) y *hak5* (D), en la acumulación de Na⁺ en raíz y parte aérea. Acumulación de Na⁺ en plantas *slah2-3*, *sultr1;2*, *sultr3;5* y *hak5* junto a sus respectivos fondos genéticos Col-3 ó Col-0, expuestas 4 h a un medio a base de 5 mM MES–Ca(OH)₂ pH 6,15 suplementado con 20 mM Na/MES o 20 mM NaNO₃. Se representan medias y SD de 6 plantas.

Figura R47. Efecto de la mutación *skor* en la acumulación de Na⁺ en raíz y parte aérea. A, Acumulación de Na⁺ en plantas *skor* junto a su respectivo fondo genético Col-0, expuestas 4 h a un medio a base de 5 mM MES–Ca(OH)₂ pH 6,15 suplementado con 20 mM Na/MES, con 20 mM NaNO₃, con 20 mM NaNO₃ + 2 mM KCl y con 20 mM NaCl. Como control de los niveles de K⁺ se representa la condición de crecimiento en medio hidropónico (1 mM KCl). B, Ratios Na⁺/K⁺ en raíz y parte aérea. C, Contenido en K⁺ en raíz y parte aérea. Se representan medias y SD de 8 plantas. Las diferencias estadísticamente significativas entre la acumulación de Na⁺ en el fondo genético silvestre y en la planta mutante se determinaron por un Student's t-test *P < 0.0001.

Los resultados mostraron que, en presencia de nitrato, las plantas *skor* disminuían el contenido en Na^+ de la raíz y aumentaban notablemente el Na^+ de la parte aérea (Figura R47). En Na/MES, no se modificó significativamente el contenido en Na^+ de la raíz, pero sí el de la parte aérea, al igual que pasó en NaCl. Al ser plantas carentes del canal SKOR, encontramos, como era previsible, una disminución en el contenido de K^+ en la parte aérea, sin embargo, no cambió el contenido en K^+ de la raíz. Atendiendo a la distribución de Na^+ . Se observó que las plantas *skor* absorbían más Na^+ por la raíz, pero también translocaban más Na^+ al xilema en comparación con el genotipo silvestre. Además, la proporción de Na^+ distribuido (Na^+ transportado al xilema respecto al Na^+ total Absorbido) también fue mayor en plantas *skor* que en la línea silvestre (Figura R48).

Figura R48. Efecto de la mutación *skor* en la absorción de Na^+ por la raíz (Na^+ total/PS raíz), la translocación al xilema (Na^+ parte aérea/PS raíz) y el porcentaje de Na^+ distribuido ($(\text{Na}^+$ parte aérea/ Na^+ total x 100)/PS raíz) en las distintas condiciones de ensayo descritas en la Figura R47.

A pesar del curioso fenotipo que en nuestras condiciones muestran las plantas *skor* respecto a la distribución del Na^+ , profundizar en este tema estaba fuera de los objetivos del trabajo. Un estudio más en detalle se abordará en un futuro.

3.4 Comparación funcional de la acumulación de Na^+ en la glicofita *Arabidopsis thaliana* y en la halofita *Eutrema salsugineum*

3.4.1 Acumulación de Na^+ en *Eutrema salsugineum*

Los resultados descritos para *Arabidopsis* mostraron que la toxicidad del Na^+ en distintas accesiones de la especie variaba de forma significativa, de modo que era posible observar ratios molares Na^+/K^+ altos en accesiones como Ts-1 o Tsu-1 sin que éstos fuesen asociados a síntomas de toxicidad iónica. Asimismo, nuestro análisis del ajuste osmótico sugiere que puede haber diferentes modelos para este ajuste y uno muy eficiente podría encontrarse en plantas con un modo de vida halófilo (Flowers and Colmer, 2008). Entre estas plantas, *Eutrema salsugineum*, anteriormente conocida como *Thellungiella halophylla* (Amtmann, 2009) está filogenéticamente próxima a *Arabidopsis* y se ha estudiado como planta modelo. Esta especie es una brasicácea halófila que acumula más Na^+ en las hojas que su pariente glicofita *Arabidopsis* (Alemán et al., 2009). Decidimos por tanto ampliar nuestro estudio sobre *Arabidopsis* realizando una comparación entre ambas especies.

Para estudiar la respuesta de *Eutrema* con más detalle utilizamos una colección de líneas transgénicas generadas por el laboratorio de la Dra. Karen Schumaker en la Universidad de Arizona, cuya expresión fue validada en un estudio previo a este trabajo, realizado por la doctoranda para su Proyecto fin de Master tal y como se describe en Materiales y Métodos y se resume en la Figura M1.

Estudiamos el crecimiento de plantas de *Eutrema* de cuatro semanas, tanto de la línea silvestre como de la línea *SOS1* silenciada, expuestas a un tratamiento de dos semanas en concentraciones crecientes de NaCl desde 0,2 hasta 160 mM (Figura R49). Los datos de peso seco de raíz no se registraron, ya que dichas raíces pesaron del orden de 3 mg, y los datos de peso seco de la parte aérea fueron los pesos de las rosetas, ya que estas plantas no florecen a menos que se las vernalice. El efecto del NaCl sobre el crecimiento de *Eutrema* empezó a ser estadísticamente significativo a 80 mM NaCl tanto en la línea silvestre como en la línea silenciada (Figura R49). A 160 mM NaCl ambas líneas resultaron notablemente inhibidas con $p < 0,0001$ respecto a su condición control a 0,2 mM NaCl. Sin embargo, el silenciamiento de *SOS1* produjo una mayor inhibición del

crecimiento y síntomas de intoxicación por Na^+ más evidentes, así a 80 mM NaCl, la línea silenciada presentó signos de amarilleamiento en alguna de sus primeras hojas los cuales se acentuaron a 160 mM NaCl donde también al genotipo silvestre le empezaron a surgir los primeros signos de toxicidad (Figura R50).

Figura R49. Inhibición en el crecimiento de *E.salsugineum* por NaCl. Peso seco de la parte aérea de plantas de Eutrema, ecotipo Shandong de las líneas silvestres (EsWT) y *SOS1* silenciada (IR-EsSOS1) de cuatro semanas de edad tratadas dos semanas con concentraciones crecientes de NaCl desde 0.2 a 160 mM. Se representan medias y SD de 8 plantas. Distinta letra indica una diferencia significativa entre las medias One-way ANOVA y Tukey's HSD test; $p < 0.05$.

Figura R50. Aspecto de las plantas de las líneas silvestres (EsWT) y *SOS1* silenciada (IR-EsSOS1) de cuatro semanas de edad expuestas dos semanas a concentraciones crecientes de NaCl.

El silenciamiento de *SOS1* provocó mayores ratios molares Na^+/K^+ en la raíz respecto al genotipo silvestre (Figura R51). En cuanto a la parte aérea, las ratios Na^+/K^+ fueron significativamente menores en la línea silenciada respecto a la silvestre (Figura R52A), un aspecto en el que difiere notablemente del mutante *sos1* de *Arabidopsis*, donde también la roseta adquiere valores de ratio Na^+/K^+ más altos. Sin embargo, esta ratio menor, sorprendentemente, no fue consecuencia de un mayor contenido en sodio en las hojas de la línea silenciada, sino de un menor contenido en K^+ (Figuras R52B y R52C).

Figura R51. Ratios molares Na^+/K^+ de raíces de plantas de las líneas silvestres (*EsWT*) y *SOS1* silenciada (*IR-EsSOS1*) de cuatro semanas de edad expuestas dos semanas a concentraciones crecientes de NaCl. Se representan medias y SD de 6 plantas.

Lo llamativo de estos resultados nos llevó a profundizar algo más en este estudio. Para ello, escogimos una concentración de NaCl externo de 120 mM (siempre con 1 mM K^+) donde ya se apreció notablemente el efecto del NaCl sobre el crecimiento, y en paralelo, llevamos una combinación isotónica de 15 -105 (KCl-NaCl) mM con el objetivo de estudiar la toxicidad del Na^+ y el patrón de distribución de K^+ . Para poder determinar con precisión el peso de las raíces, estos ensayos se realizaron en plantas de 6 semanas de edad y 3 semanas de tratamiento (Figura R53).

Figura R52. Ratios molares Na^+/K^+ y contenidos en Na^+ y K^+ de la parte aérea de plantas de las líneas silvestres (*EsWT*) y *SOS1* silenciada (*IR-EsSOS1*) de cuatro semanas de edad expuestas dos semanas a concentraciones crecientes de NaCl. Se representan medias y SD de 6 plantas.

Figura R53. Peso seco (A), ratios molares Na⁺/K⁺ (B) y contenidos de Na⁺ (C) y K⁺ (D) en raíz y parte aérea de plantas de las líneas silvestres (*EsWT*) y *SOS1* silenciada (*IR-EsSOS1*) de seis semanas de edad expuestas tres semanas a condiciones control 1-0,2 (KCl-NaCl) mM y a condiciones isotónicas 1-120 y 15-105 (KCl-NaCl) mM. Se representan medias y SD de 6 plantas. Letras diferentes indican que las diferencias entre las medias son estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones. Asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos distintos: ns, no significativamente distintos; p < 0.05. ****, p < 0.0001; ***, 0.0002 < p < 0.0005; **, 0.005 < p < 0.01; *, 0.01 < p < 0.05. Two-way ANOVA y Fisher's LSD test.

Los resultados indicaron que las raíces de la línea IR-*EsSOS1* se inhibieron significativamente en ambas condiciones salinas, mientras que en las raíces de la línea silvestre no se apreció una inhibición notable del crecimiento. Atendiendo a la parte aérea, ambos tratamientos inhibieron por igual el crecimiento de las rosetas de *Eutrema*, tanto en el genotipo silvestre como en el *SOS1* silenciado (Figura R53A).

La presencia de condiciones salinas, produjo un mayor aumento en el contenido en Na^+ de las raíces de las plantas IR- *EsSOS1* respecto a las del genotipo silvestre (Figura R53B y R53C, paneles izdos). En la parte aérea, el contenido en Na^+ fue similar entre los genotipos silvestre y *SOS1* silenciado (Figura R53B, panel dcho), mientras que la ratio Na^+/K^+ de las plantas *SOS1* silenciadas fue significativamente menor que en la línea silvestre (R53C, panel dcho) debido a un mayor contenido de K^+ en las hojas (R53D, panel dcho). Esto sucedió independientemente de las condiciones salinas externas. Como cabía esperar, un aumento en el K^+ externo redujo las ratios Na^+/K^+ al aumentar el contenido en K^+ interno frente al contenido en Na^+ , tanto en la raíz como en la parte aérea, pero el cambio fue moderado, teniendo presente que la ratio exterior Na^+/K^+ varió de 120 a 7 (Véase el efecto de los dos tratamientos salinos en Figura R53).

En cuanto a los efectos de toxicidad por Na^+ , 1-120 (KCl-NaCl) mM produjo signos de daño en las hojas en forma de amarilleamiento y senescencia de las hojas más viejas que no mejoraron significativamente al aumentar el K^+ externo (Figura R54). Como, notablemente, tampoco mejoró el peso seco (Figura R53). Esto sugiere que los síntomas de la línea silenciada, daños foliares y menor crecimiento, no dependen demasiado del contenido en Na^+ .

En estos resultados, el hecho llamativo de que la línea *SOS1* silenciada tuviese más K^+ en las hojas que su correspondiente fondo silvestre, independientemente de la condición salina ensayada nos llevó a pensar que en determinadas condiciones *SOS1* de *Eutrema* pudiese transportar K^+ .

Empleando el catión Rb^+ como análogo del K^+ , pudimos ampliar la base de esta hipótesis. En estos ensayos se tomaron muestras de plantas de *Eutrema* de las líneas silvestre y silenciada a lo largo de 18 días de tratamiento con 0,5 mM KCl – 0,5 mM RbCl - 120 mM NaCl (Figura R55). Los resultados mostraron que *Eutrema* discrimina poco entre K^+

y Rb^+ ya que muy pronto las ratios Rb^+/K^+ en la raíz y en la roseta llegaron a $\approx 1,0$. En la roseta la ratio permaneció en $\approx 1,0$, pero en la raíz llegó a $\approx 1,5$. Además, en la raíz, la línea silenciada acumuló el Rb^+ más deprisa aunque en el estado estacionario eran iguales, $\approx 1,5$. Estos resultados demuestran que en presencia de 120 mM Na^+ las raíces de la línea silenciada toman Rb^+ mejor que K^+ o sacan K^+ más eficientemente que en la línea silvestre. Sin embargo, la transferencia neta de Rb^+ a la roseta es probablemente peor en la línea silenciada, ya que la mayor concentración de Rb^+ en la raíz no conduce a una mayor acumulación en la roseta. Con relación al Na^+ , el empleo de Rb^+ no añadió nada a lo descrito antes para el K^+ (Figura R53), mayores ratios Na^+/K^+ y Na^+/Rb^+ en la raíz y menores en la roseta.

Figura R54 Aspecto de plantas de las líneas silvestres (*EsWT*) y *SOS1* silenciada (*IR-EsSOS1*) de seis semanas de edad expuestas tres semanas a condiciones control, 1-0.2 (KCl-NaCl) mM y a condiciones isotónicas 1-120 y 15-105 (KCl-NaCl) mM

Atendiendo al posible papel de *EsSOS1* en el transporte de K^+ , se procedió a la caracterización funcional del gen *EsSOS1* mediante la expresión heteróloga del cDNA en mutantes de transportadores de K^+ de bacterias y de levaduras.

Figura R55. Ratios molares Rb^+/K^+ (A), Na^+/K^+ (B) y Na^+/Rb^+ (C) en raíz y parte aérea de plantas de las líneas silvestres (*EsWT*) y *SOS1* silenciada (IR-*EsSOS1*) de seis semanas de edad expuestas a lo largo de 18 días a un tratamiento con 0,5 mM KCl – 0,5 mM RbCl – 120 mM NaCl. Se representan medias y SD de 3 plantas por día. Asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos distintos: ns, no significativamente distintos; $p < 0.05$. ****, $p < 0.0001$; ***, $0.0002 < p < 0.0005$; **, $0.005 < p < 0.01$; *, $0.01 < p < 0.05$. One-way ANOVA y Tukey's HSD test.

3.4.2 Función del transportador SOS1 de *Eutrema salsugineum*

3.4.2.1 Caracterización funcional del gen *EsSOS1* en bacteria

Para la caracterización funcional en bacterias se utilizó el mutante de *Escherichia coli* TKW4205, el cual es deficiente en el transporte de K^+ por la ausencia de los sistemas de entrada de K^+ Kdp1, TrkA y Kup (Schleyer et al., 1993). Se realizaron los diferentes

subclonajes en el vector de expresión en bacteria pBAD dependiente de arabinosa (Guzman et al., 1995) y se comprobó la funcionalidad de los genes *SOS1* de Arabidopsis y de Eutrema en el mutante TKW42 en condiciones de pH ácido y alcalino.

Los resultados mostraron que a pH 5,5 y 10 μ M Arabinosa, el transportador SOS1 de Eutrema rescató el fenotipo de falta de K^+ en el mutante bacteriano a una concentración de K^+ externo de 5 mM mientras que el transportador SOS1 de Arabidopsis lo hizo a una concentración de K^+ de 10 mM (Figura R56A). Por otro lado, a pH alcalino de 7,5 y 10 μ M Arabinosa, el fenotipo de complementación cambió, ya que SOS1 de Eutrema apenas complementó mientras que el SOS1 de Arabidopsis rescató el fenotipo a 5 mM K^+ externo (Figura R56B).

Figura R56. Crecimiento de cepas mutantes **TKW4205** transformadas con el plásmido de expresión en bacterias pBAD24 vacío, con el cDNA *AtSOS1* o con el cDNA *EsSOS1* inserto. Se sembraron tres gotas de diluciones seriadas de cultivos de ambas cepas en medio mínimo ajustado a (A), pH 5,5 suplementado con 10 μ M arabinosa y KCl a 5 y 10 mM. (B), pH 7,5 suplementado con 10 μ M arabinosa y KCl a 5 y 10 mM.

R.4.2.2 Caracterización funcional del gen *EsSOS1* en levadura

3.4.2.1 Caracterización funcional del gen *EsSOS1* en levadura

A continuación, se procedió a la caracterización funcional del gen *SOS1* de Eutrema en el mutante de *Saccharomyces cerevisiae* AXT3K, el cual es deficiente en los sistemas de salida de Na^+ ENA1-4 y además, en el antiportador Na^+/H^+ vacuolar NHA1 (Quintero et

al., 2002). Para ello, se clonaron los cDNAs del transportador SOS1 de *Eutrema* y de *Arabidopsis* en el vector de expresión pYPGE15, (Brunelli and Pall, 1993) y se coexpresaron en AXT3K junto con el plásmido pFL32T que portaba los cDNAs de los genes reguladores *SOS2* y *SOS3* (cedido por F.J. Quintero).

Los ensayos de complementación por crecimiento en gota mostraron que, como era previsible, *EsSOS1* rescató el fenotipo de sensibilidad al sodio a 50 mM NaCl (1 mM KCl) a pH 6.5 siempre y cuando estuvieran coexpresados los componentes principales de la ruta de activación SOS2 y SOS3 (Figura R57). Cuando se acidificó el pH hasta 4,5 la complementación mejoró y se observó crecimiento a una concentración de NaCl de hasta 100 mM. Sin embargo, a pH alcalino de 8.0 nunca se observó complementación.

Figura R57. Crecimiento de mutantes de levadura AXT3K ($\Delta ena1-4$, $\Delta nha1$, $\Delta nhx1$) transformados con: el plásmido pYPGE15 vacío; con el plásmido pYPGE15 conteniendo el cDNA *EsSOS1* inserto; con el plásmido pYPGE15 conteniendo el cDNA *EsSOS1* inserto más el plásmido pFL32T conteniendo el cDNA de *AtSOS2* y *AtSOS3* insertos y por último con el plásmido pYPGE15 vacío más el plásmido pFL32T conteniendo el cDNA de *AtSOS2* y *AtSOS3* insertos. Se sembraron gotas de diluciones seriadas de dichas cepas en medio mínimo (PA) sólido suplementado con 1 mM KCl más 50 ó 100 mM NaCl a pH 6.5 y pH 4.5

Para precisar los resultados de los ensayos de crecimiento en gota decidimos comparar la capacidad de crecimiento de los transformantes en distintas condiciones del medio de cultivo utilizando el Microbiology Reader Bioscreen C. De este modo se obtuvieron

curvas de crecimiento comparativas utilizando diferentes *pH*s y diferentes concentraciones de Na^+ y de K^+ en el medio de ensayo. Los datos obtenidos corroboraron que, el transportador SOS1 de *Eutrema*, al igual que el de *Arabidopsis*, complementó el fenotipo de toxicidad por sodio (Figura R58) a todos los *pH*s ensayados incluso en condiciones de 100 veces más Na^+ externo que K^+ 0,5-50 (KCl-NaCl) mM. No obstante, volvía a quedar patente la diferencia entre el funcionamiento del SOS1 de *Arabidopsis* y del SOS1 de *Eutrema* en función del *pH* del medio. Así, la acidificación del medio mejoró el crecimiento de los transformantes *EsSOS1* respecto a los *AtSOS1* mientras que la alcalinización del medio mejoró el crecimiento de los transformantes *AtSOS1* respecto a los *EsSOS1*. Estos estudios muestran que el transportador SOS1 de *Eutrema* se comporta como un transportador SOS1 característico. Y sugieren una dependencia del *pH* diferente a la que pudiera tener el transportador SOS1 de *Arabidopsis*.

Figura R58. Curvas de crecimiento de los transformantes *AtSOS1* y *EsSOS1* en la cepa mutante de levadura **AXT3K** ($\Delta\text{ena1-4}$, Δnha1 , Δnhx1) a *pH* 5,0 6,5 y 7,5. Se muestra el crecimiento como DO medida a 600 nm. Los cultivos se realizaron en medio PA líquido suplementado con 0,5 mM KCl y 50 mM NaCl para *pH* 5,0. y *pH* 6,5 y con 0,5 mM KCl y 20 mM NaCl para *pH* 7.5. Todos los transformantes incluían el plásmido pFL32T con *AtSOS2* y *AtSOS3* insertos.

Para estudiar el posible papel del SOS1 como transportador de K^+ decidimos ensayar el crecimiento de los transformantes *EsSOS1* en la cepa de *Saccharomyces* MA5, que carece de los sistemas de entrada de K^+ TRK1 y TRK2 y de salida de Na^+ ENA1-4 y NHA1 (Benito et al., 2004). Esta cepa requiere para cubrir sus requerimientos de K^+ una concentración del catión del orden de 30-50 mM en el medio, por lo que decidimos

estudiar si la expresión de *EsSOS1* en esta cepa rescataba la capacidad de crecer a bajas concentraciones de K^+ . Los resultados mostraron cómo la expresión de *EsSOS1* permitió un crecimiento moderado de los transformantes a partir de una concentración de 0,5 mM K^+ (0 mM Na^+) (Figura R59). Estos datos sugieren un papel del *EsSOS1* en el transporte de K^+ .

Figura R59. Curvas de crecimiento de los transformantes *EsSOS1* en la cepa mutante de levadura MA5 ($\Delta trk1$, $\Delta trk2$, $\Delta ena1-4$, $\Delta nha1$) a pH 6,5. Se muestra el crecimiento como DO medida a 600 nm. Los cultivos se realizaron en medio PA líquido, suplementado con 0,5 mM KCl, 1 mM KCl y 10 mM KCl. Todos los transformantes incluían el plásmido pFL32T con *AtSOS2* y *AtSOS3* insertos.

Cuando en estos ensayos de crecimiento variamos las concentraciones de K^+ y Na^+ en el medio, se observó como a medida que se incrementaba la concentración de Na^+ , empeoraba el crecimiento del transformante control frente al *EsSOS1*. La combinación de K^+ y Na^+ que aportó tanto un mayor crecimiento del transformante *EsSOS1* como una mayor diferencia entre los crecimientos de pYPGE15 y *EsSOS1* (ambos coexpresando pFL32T) fue la de 3 mM KCl / 20 mM NaCl por lo que fue la combinación elegida para completar la caracterización funcional y tener más evidencias de que el transportador SOS1 de *Eutrema* podía transportar K^+ .

Realizamos estudios cinéticos de entrada y acumulación de cationes a lo largo de un tiempo de 6 horas en las cepas mutantes de levaduras MA5 y AXT3K que expresaban el cDNA de *SOS1* de *Eutrema*. Utilizando Rb^+ pudimos comparar la acumulación interna del Rb^+ a lo largo del tiempo entre transformantes que expresaban los plásmidos control y los que expresaban el *EsSOS1*. Observamos que, para poder detectar diferencias en el

transporte de Rb^+ era necesario incubar las levaduras durante la noche con Na^+ (10 mM KCl + 20 mM NaCl) en MA5 y (3 mM KCl + 20 mM NaCl) en AXT3K, con el objetivo de tener las células cargadas de sodio a la hora de la cinética (Véase Figura R60B y Figura R60C). La adición al medio de 3 mM RbCl + 20 mM NaCl para MA5 y 3 mM RbCl para AXT3K resultó en una diferencia en la acumulación de este catión entre el control y el *EsSOS1* transformante, tanto en la cepa MA5 (Figura R60A) como en la AXT3K (Figura 60B). Y, aunque el patrón de entrada de Rb^+ en MA5 indica que entra más ión cuando está presente el *EsSOS1*, las diferencias más notables se encontraron en AXT3K. Estos resultados señalan que *EsSOS1* podría transportar Rb^+ .

Figura R60. Entrada de Rb^+ en los mutantes de levadura MA5 (A) y AXT3K (B y C) transformados con el plásmido vacío (círculos blancos) o con el cDNA *EsSOS1* inserto (triángulos negros). A, los transformantes en MA5 se incubaron toda la noche en PA suplementado con 10 mM KCl y 20 mM NaCl y se ensayaron en presencia de **3 mM Rb^+ + 20 mM NaCl**; B, los transformantes en AXT3K se incubaron toda la noche en PA suplementado con 3 mM KCl y 20 mM NaCl y se ensayaron en **3 mM Rb^+** ; C, los transformantes en AXT3K se incubaron toda la noche con PA suplementado con 1 mM KCl (sin Na^+) y se ensayaron en **3 mM Rb^+** . ^aTodos los transformantes incluyen el plásmido pFL32T con *AtSOS2* y *AtSOS3* insertos.

Nos preguntamos entonces si las diferencias entre *AtSOS1* y *EsSOS1* encontradas en función del pH eran debidas a la expresión de esos genes en el mutante de levadura AXT3K o eran de carácter general. Para contestar esa pregunta se compararon curvas de crecimiento de transformantes expresando *AtSOS1* y *EsSOS1* en el mutante MA5 a diferentes pHs y bajo distintas concentraciones de Na⁺ y K⁺. Se observó que las diferencias dependientes de pH encontradas en los crecimientos de los transformantes en AXT3K, se repitieron para MA5, de modo que, a pH ácido, la expresión de *EsSOS1* mejoró el crecimiento frente a la expresión de *AtSOS1* mientras que a pH alcalino ocurrió al revés (Figura R61).

Figura R61. Curvas de crecimiento de los transformantes *AtSOS1* y *EsSOS1* en la cepa mutante de levadura **MA5** ($\Delta trk1$, $\Delta trk2$, $\Delta ena1-4$, $\Delta nha1$) a pH 6,5. Se muestra el crecimiento como DO medida a 600 nm. Los cultivos se realizaron en medio PA líquido, suplementado con 3 mM KCl y 20 mM NaCl. Todos los transformantes incluyen el plásmido pFL32T con *AtSOS2* y *AtSOS3* insertos.

Para averiguar si estas diferencias en el crecimiento de los transformantes *EsSOS1* y *AtSOS1* dependientes del pH correlacionaban con diferencias en los contenidos de Na⁺ y K⁺, crecimos los transformantes de la cepa MA5 en matraces con medio líquido durante 24 horas a 3-20 (KCl-NaCl) mM y tomamos muestras de los contenidos internos (Figura R62A). Los resultados de densidad óptica repitieron el patrón anteriormente descrito para los cultivos de crecimiento en bioscreen (Figura R61). Los contenidos internos de Na⁺ mostraron que a pH 4,5, tanto *EsSOS1* como *AtSOS1* redujeron el contenido en sodio de la cepa sin transformar pero a los pH más altos solo *AtSOS1* fue efectivo (Figura R62B y R62C). Estos resultados explican la estimulación del crecimiento por *AtSOS1* respecto a *EsSOS1* y a la cepa control a pHs 6,5 y 7,5, pero no explican el mejor crecimiento de la

cepa expresando *EsSOS1* a pH 4,5, lo que parece ocurrir con independencia del contenido en Na^+ o de la ratio Na^+/K^+ . Profundizar más en este tema estaba fuera de los objetivos de este trabajo pero para finalizar nuestro estudio comparativo quisimos evaluar la respuesta de *Eutrema* a la entrada de Na^+ .

Figura R62. A, Crecimiento. B, ratios Na^+/K^+ . C, contenidos internos de Na^+ en los transformantes *AtSOS1* y *EsSOS1* de la cepa mutante de levadura **MA5** (Δtrk1 , Δtrk2 , $\Delta\text{ena1-4}$, Δnha1) a distintos pHs. 24 h de crecimiento en medio PA suplementado con 3 mM KCl-20 mM NaCl. Se representan medias y SD de 4 muestras por condición y genotipo.

3.4.3 Entrada de Na^+ en Eutrema

Para concluir nuestros estudios de comparación funcional, nos preguntamos si la toma de Na^+ en Eutrema era similar a la de Arabidopsis en términos de estimulación por nitrato. Para contestar esa pregunta realizamos ensayos de entrada de Na^+ en Eutrema comparando el efecto de 20 mM Na^+ en forma de Na/MES, NaNO_3 , y también Na_2SO_4 y NaCl, en la acumulación de Na^+ tras cuatro horas de ensayo. Los resultados pusieron de manifiesto tres diferencias fundamentales respecto a Col-0: La primera, que el sulfato estimuló la entrada de Na^+ tanto como el nitrato mientras que el Na/MES y el NaCl parecían ejercer el mismo efecto que sobre plantas Col-0 (Figura R63). La segunda, que la velocidad de entrada de Na^+ es menor en Eutrema que en Col-0. La tercera, que apenas hay transferencia de Na^+ a la parte aérea (Figura R63; Figura R33B). Así, mientras la acumulación en la raíz de plantas de Eutrema fue algo menor que para plantas Col-0, la acumulación en la parte aérea fue significativamente menor que en Col-0, incluso menos de la mitad de la acumulación en Ws (Figura R63; Figura R33B).

Figura R63. Efecto de diferentes aniones en la acumulación de Na^+ en la raíz y la parte aérea de plantas de Eutrema silvestres ecotipo Shandong expuestas 4 h a 20 mM Na/MES y a 20 mM NaNO_3 . A, Ratios Na^+/K^+ . B, Concentración de Na^+ . Se representan medias y SD de 8 plantas. One-way ANOVA y Tukey's HSD test; $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

4.DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis doctoral se ha abordado el estudio de la respuesta fisiológica al Na^+ de las plantas glicofitas utilizando la especie modelo *Arabidopsis thaliana* en un contexto agronómico, es decir, utilizando concentraciones de NaCl similares a las que se pueden encontrar en suelos de cultivo salinizados que habitualmente reducen la producción agrícola sin matar a la planta. Además, para entender mejor la toxicidad del Na^+ se ha hecho un esfuerzo por separar los efectos tóxicos iónicos y osmóticos del Na^+ sobre la planta y el grado de variación natural que existe respecto a la toxicidad en esta especie. Nuestra caracterización fisiológica abarcó también la entrada y acumulación de Na^+ en *Arabidopsis*, así como un estudio transcriptómico de la planta durante la entrada de Na^+ . Finalmente, realizamos una comparación de los efectos del Na^+ sobre plantas glicofitas y halofitas utilizando como modelo la especie *Eutrema salsuginea*.

4.1 Sistema Experimental

A la hora de abordar este estudio, se necesitaba desarrollar un sistema experimental robusto que optimizase la reproducibilidad de los resultados. Para ello, hemos adoptado una técnica de crecimiento de plantas en medio hidropónico que garantizara que la toma y el procesamiento de muestras se realizara de forma sencilla, limpia y evitando contaminaciones de Na^+ y K^+ . Conseguimos reducir a niveles muy bajos el Na^+ de la agarosa del soporte de la semilla y el del medio de crecimiento e implementamos unos tiempos adecuados de lavado de raíz. Por otro lado, ha sido necesario estudiar los efectos del programa de desarrollo de la planta sobre el patrón de acumulación de Na^+ . En este sentido, hemos observado que la aparición de la inflorescencia tiene un gran impacto sobre la acumulación de Na^+ , ya que se da una significativa exclusión del Na^+ en este compartimento, lo que tiene como efecto colateral un gran incremento de Na^+ en la roseta. En ocasiones, ha sido necesario adaptar el protocolo de toma de muestras para poder comparar genotipos con distinto tiempo de floración.

También es importante discutir la utilización que hemos hecho en muchos de nuestros ensayos del parámetro ratio molar Na^+/K^+ como un indicador del contenido en Na^+ de los órganos de la planta. La ventaja de utilizar la ratio Na^+/K^+ frente a otros indicadores

(basado en el peso seco, por ejemplo), que no tienen en cuenta el contenido de K^+ , es considerar que, si comparamos tratamientos donde el NaCl externo aumenta, el contenido de Na^+ más K^+ referido a peso seco no es constante ya que el contenido en Na^+ aumenta a un mayor ritmo que el contenido en K^+ decrece (Véase los datos de Na^+/PS y K^+/PS en Tablas R1 y R5), dificultando la comparación de distintas condiciones experimentales. Un ejemplo de la conveniencia de usar la ratio Na^+/K^+ se obtiene cuando comparamos plantas Col-0 tratadas con 40 mM NaCl (Tabla R1) y con 5 mM KCl más 55 mM NaCl (Tabla R5). En ambos casos, el contenido en Na^+ de la roseta era de 1500 nmol mg^{-1} , pero mientras las plantas a 40 mM Na^+ mostraron hojas cloróticas (Figura R7A), todas las hojas estaban verdes en la condición 5-55 (Figura R18C). Como se puede observar, los efectos de toxicidad del Na^+ no correlacionan con el contenido en Na^+ relativo a peso seco, pero sí con las ratios molares Na^+/K^+ , que fueron de 5,2 y 2,6 respectivamente.

4.2 Análisis funcional y genético de la acumulación de Na^+ en Arabidopsis.

4.2.1 Efecto tóxico del Na^+

Se acepta de manera general que las plantas en condiciones de salinidad reducen el crecimiento en dos fases: una respuesta rápida a la disminución del potencial osmótico y una fase más lenta debida a la acumulación de Na^+ en las hojas (Munns and Tester, 2008). En las plantas Col-0 ninguno de estos efectos es apreciable a concentraciones inferiores a 20 mM NaCl; pero a concentraciones superiores, las plantas Col-0 inhiben su crecimiento y presentan clorosis en sus hojas. Por ello, los análisis de las plantas crecidas a 20 mM NaCl permiten identificar los umbrales de ratios molares Na^+/K^+ en raíz y en parte aérea que no son tóxicos. Con esta aproximación, los umbrales fueron 0,32 en raíz y 0,66 en roseta (Tabla R2).

No obstante, para una mejor determinación de estos umbrales utilizamos los mutantes *hkt1-4* (Berthomieu et al., 2003; Sunarpi et al., 2005; Rus et al., 2004; 2006; Davenport et al., 2007; Gierth and Mäser, 2007) y *sos1-1* (Shi et al., 2002; Qiu et al., 2003; Davenport et al., 2007), ya que estos mutantes acumulan excesos de Na^+ en la roseta y en la raíz, respectivamente, y la disminución del crecimiento se produce a potenciales osmóticos lejos de los que pueden producir déficit hídrico. En estos dos mutantes, la inhibición en el crecimiento se produjo a 4,0 y 2,0 mM NaCl, respectivamente. Comparando las ratios

de raíz y parte aérea de los mutantes en dichas condiciones externas con las ratios “no tóxicas” de plantas Col-0 a 20 mM pudimos determinar que la inhibición del crecimiento por Na^+ en plantas *hkt1-4* estaba causada por unas ratios Na^+/K^+ tóxicas para la parte aérea pero no para la raíz. Por la misma razón, la inhibición en el crecimiento de plantas *sos1-1* se debía a unas ratios Na^+/K^+ tóxicas para la raíz y no para la parte aérea (Tabla R2; Tabla R4; Figura R12). Cuando incrementamos las concentraciones de NaCl externas hasta unas concentraciones que inhibían el crecimiento de forma similar en ambos mutantes (Figuras R15A y R15B) observamos que, atendiendo únicamente al crecimiento y al tamaño de las plantas, la toxicidad en parte aérea de plantas *hkt1-4* y la toxicidad en raíz en plantas *sos1-1* son difíciles de distinguir debido a que las plantas crecen de manera coordinada y así, plantas que sólo tienen afectada la parte aérea presentan raíces más pequeñas y plantas cuyas las raíces están intoxicadas acaban produciendo partes aéreas menores. Estas podrían ser respuestas de señalización a larga distancia que ocurren cuando las plantas sufren alguna condición de estrés general, incluyendo una carencia de nutrientes o ataque biológico (Liu et al., 2009.; Sparks et al., 2013). En Arabidopsis, y también en otras especies, una inhibición en la raíz y en la parte aérea posiblemente tengan efectos similares sobre el tamaño de la planta por lo que es fácil que estos dos tipos de inhibición puedan confundirse y se necesite de otro tipo de observaciones para determinar la localización de la toxicidad.

Analizando conjuntamente los resultados de los ensayos descritos se puede concluir, que en plantas Col-0, ratios molares Na^+/K^+ de 1,0 y 0,3 no son tóxicas en rosetas y raíz respectivamente, sin embargo, incrementos moderados de esas ratios podrían resultar tóxicos. Estas ratios relativamente bajas sugieren una alta sensibilidad de la planta que, en principio, es una característica de Col-0 que no debería asociarse a una característica general de Arabidopsis. Para probar esta hipótesis utilizamos la accesión Ts-1, que se supone muy tolerante a Na^+ (Rus et al., 2006), en la que encontramos ratios Na^+/K^+ muy altas. A 20 mM NaCl, una ratio en la roseta de 3,1 no era tóxica (Tabla R1). Incrementando la concentración de NaCl y asumiendo que los signos de toxicidad en la roseta eran los que encontramos en el mutante *hkt1* (Figura R15), no se observaron signos de daño por toxicidad de Na^+ en plantas a 40 mM NaCl o a 60 mM NaCl, y sólo algún signo en plantas a 80 mM (Figura R4). En las rosetas (parte aéreas) de esas plantas, las ratios Na^+/K^+ eran de 5,8, 8,8 y 19,2 respectivamente (Tabla R1).

La toxicidad de Na^+ en el citosol de células no animales se ha discutido ampliamente en la introducción. Al contrario de lo que ocurre en células animales, no hay datos convincentes que indiquen una alta toxicidad por Na^+ en células no animales debido a razones bioquímicas (Cheeseman, 2013; Kronzucker et al., 2013). De hecho, una ratio Na^+/K^+ de 2 en el citoplasma es tolerada por el hongo *Ustilago maydis* (Benito et al., 2009). Por tanto, asumiendo el gran volumen vacuolar presente en muchas células vegetales y su capacidad para acumular Na^+ en la vacuola (Shabala and Cuin, 2008; Munns and Tester, 2008; Hasegawa, 2013; Roy et al., 2014) podría esperarse encontrar altas ratios Na^+/K^+ en tejidos vegetales sin observar por ello graves síntomas de toxicidad. Este razonamiento explicaría las altas ratios Na^+/K^+ observadas en la parte aérea de las plantas Ts-1 sin síntoma alguno de toxicidad. De la misma forma, la toxicidad por Na^+ que se genera con bajas ratios Na^+/K^+ en el tejido, como ocurre en la raíz y parte aérea de Col-0, podría reflejar una baja capacidad para acumular Na^+ en las vacuolas. Sin embargo, no se puede descartar que en estos casos lo que se observa sea una atípica sensibilidad al Na^+ citosólico. De cualquier forma, debemos advertir que, aunque resulta conveniente utilizar la ratio molar Na^+/K^+ para comparar tratamientos distintos en una misma accesión, no es aconsejable utilizar este parámetro para comparar un mismo tratamiento en accesiones diferentes.

Aunque la toxicidad de Na^+ es indudablemente importante, la disminución del crecimiento debida a NaCl parece no deberse solo a toxicidad, ya que concentraciones isotónicas de Na^+ más K^+ cambiaron drásticamente las ratios Na^+/K^+ y los síntomas en Col-0, pero no modificaron el crecimiento de Col-0, sensible al Na^+ a bajo K^+ , o Ts-1, insensible al Na^+ a bajo K^+ (Figura R18). Esta disminución del crecimiento podría ser de notable relevancia en Arabidopsis y en otras plantas, como se describe más adelante.

Respecto a la toxicidad del Na^+ , en nuestros análisis de variación natural observamos que sólo hay un efecto significativo de toxicidad de Na^+ en algunas de las accesiones de Arabidopsis estudiadas. Esta intoxicación que conlleva inhibición del crecimiento y muerte de la planta es además independiente de la actividad de HKT1 ya que accesiones con un marcado hipomorfismo en este transportador presentaron sensibilidades muy diferentes al Na^+ . Por el contrario, el efecto inhibitorio de la exposición a NaCl sobre el crecimiento de la planta es común a la mayoría de accesiones estudiadas y parece estar desencadenado por un mecanismo que no está asociado a la toxicidad del Na^+ , como ya

se ha indicado. Así, la dramática inhibición que sufrieron las plantas Ak-1, C24 y Fei-0 en 60 mM NaCl (Figuras R23) fue probablemente el resultado de toxicidad en las hojas. Primero, porque el aspecto de esas plantas en 60 mM NaCl era muy similar al que presentaban las plantas *hkt1* a 16 mM Na⁺, y segundo, porque los signos de toxicidad por Na⁺ desaparecieron completamente o se aliviaron al incrementar la concentración de K⁺ en el medio. Aún así, la inhibición del crecimiento de estas accesiones solo mejoró parcialmente en los tratamientos con combinaciones isotónicas KCl-NaCl (Figura R24), lo que sugiere que la inhibición restante no se debe a un efecto iónico del Na⁺. Esta inhibición parcial no tóxica coincide con la inhibición principal en *Ler-0*, *Tsu-1*, *L1-0* y *Sha*, que no sufren toxicidad.

La toxicidad por Na⁺ en la parte aérea conllevó un amarilleamiento de las hojas, el cual ha sido descrito como signo asociado al efecto tóxico del Na⁺ (Rajendran et al., 2009). Este amarilleamiento correlaciona en nuestros ensayos con un menor contenido en clorofila, parámetro que ha sido utilizado en numerosos trabajos como medida del estatus metabólico y de toxicidad en las hojas (Munns and Tester, 2008; Yeo and Flowers, 1983). La toxicidad por Na⁺ asociada a la raíz revela una inhibición dramática en el crecimiento de ésta que correlaciona con el oscurecimiento de las hojas y acumulación de antocianinas (Figura R16A). Está descrito que la respuesta osmótica aumenta los niveles de antocianinas (Chalker-scott, 1999) por lo que una conclusión sobre contenidos en antocianinas obtenidas en un mutante *sos1*, donde la vía SOS parece formar parte de una red de señalización más compleja, debería ser tomada con cautela (Ji et al., 2013) sin excluir la posibilidad de efectos pleiotrópicos en estos mutantes que afecten de una manera significativa a la respuesta osmótica o nutricional.

Adicionalmente, los resultados con las líneas RILs coincide con lo descrito en las accesiones, observándose inhibiciones del crecimiento que están asociadas o que no lo están a la toxicidad del Na⁺. A pesar de esta dualidad de respuestas, la inhibición del crecimiento en *Arabidopsis* es independiente de la actividad de HKT1, si bien hay que destacar la importancia de este transportador en la distribución del Na⁺ entre raíz y parte aérea. Parece razonable pensar entonces, que los efectos tóxicos del Na⁺ en *Arabidopsis* dependen de una sensibilidad tisular variable en cada accesión.

En resumen, nuestros resultados y otros anteriores (Labidi et al., 2002; Attia et al., 2008; Jha et al., 2010; Katori et al., 2010) sugieren que existe una gran diversidad de respuesta entre accesiones respecto a la acumulación y la toxicidad por Na^+ . Por el contrario, como veremos, la inhibición del crecimiento independiente de la toxicidad del Na^+ y la osmoregulación, son similares en todas las accesiones que hemos estudiado.

4.2.2 Efecto Osmótico del Na^+

Partiendo de la hipótesis de que los efectos inhibitorios sobre el crecimiento causados por el NaCl se deben solo al estrés osmótico y a la toxicidad del Na^+ (Munns, 2002; Munns and Tester, 2008), los casos en los que la ausencia de toxicidad es evidente sugieren que el efecto osmótico es el causante de una parte importante de la inhibición en Arabidopsis. El NaCl reduce el potencial de agua del medio externo y la inhibición de tipo osmótico producida en plantas podría deberse a un déficit hídrico (Morgan, 1984). Sin embargo, plántulas de Col-0 y Ts-1 crecidas dos semanas en condiciones estériles mostraron un claro déficit hídrico a 120 mM sorbitol pero no a 10–50 (KCl-NaCl) mM (Figura R19A). La idea de que plantas expuestas a tratamientos salinos mantienen el contenido en agua mientras que plantas tratadas con sorbitol no lo hacen, es coherente con resultados previos descritos en cultivos celulares de tomate tratados con polietilenglicol (Handa et al., 1983) y cultivos celulares de tabaco tratados con NaCl, dextrano o polietilenglicol (Heyser and Nabors, 1981a; 1981b). Estos resultados también son coherentes con las respuestas de plantas de tomate tratadas con manitol y NaCl (Slatyer, 1961) y con las de plantas de algodón y pimiento en tratamientos de salinidad y sequía (Shalhevet and Hsiao, 1986).

En los ensayos de medida de la respuesta osmótica la observación dominante fue la ausencia de déficit hídrico y un notable aumento del contenido en K^+ más Na^+ (Figuras R19B y R20B) lo que es consistente con estudios anteriores (Pardo and Quintero, 2002; Flowers et al., 2015), y sugiere la existencia de un ajuste osmótico que previno el déficit hídrico. En este sentido, hay gran cantidad de estudios que demuestran que muchas especies de plantas tratadas con NaCl son capaces de ajustarse osmóticamente a la vez que mantienen el contenido en agua y el turgor (Boyer, 1965; Robinson et al., 1983; Salim et al., 1989; Fricke et al., 1996; Shabala, 2002; Munns, 2002; Bartels and Sunkar, 2005; Maggio et al., 2007; Munns and Tester, 2008; Jha et al., 2010; Díaz-López et al., 2012; Hasegawa, 2013).

La idea de que las plantas se adaptan y sobreviven incrementando la concentración de iones internos, está bien establecida en las plantas halófilas (Flowers et al., 1977; Flowers et al., 2015), pero lo está menos en las glicofitas, en las que existe una cierta controversia sobre el procedimiento de adaptación osmótica. Algunos autores señalan que las glicofitas no son muy diferentes de la halofitas y en condiciones de salinidad se ajustan osmóticamente acumulando solutos iónicos (Bernstein, 1961, 1975; Hsiao et al., 1976; Cuin et al., 2009; Genc et al., 2016;), pero otros proponen que el estrés osmótico generado por las condiciones de salinidad producen un déficit hídrico (Revisado en Munns, 2002; Hasegawa, 2013). Nuestros resultados con diversas accesiones de *Arabidopsis* en concentraciones moderadas de NaCl por tiempos largos (60 mM NaCl durante una y dos semanas) demuestra que el déficit hídrico no existe y que hay una adaptación osmótica (Figuras R20 y R21) basada en la acumulación de Na^+ y K^+ .

Par poder utilizar sustratos no iónicos, ensayamos choques osmóticos elevados (400 mOsm) en periodos de tiempo de 24 horas que evitaban el crecimiento microbiano. En estos experimentos, confirmamos que *Arabidopsis* no muestra ajuste osmótico o que éste es muy pobre en condiciones de choque osmótico no iónico. Las plantas en sorbitol, manitol, Na/MES, NMDG/Cl, o NMDG/MES exhibieron un marchitamiento permanente y una pérdida continua de agua que llegó al 50% aproximadamente en 24 h (Tabla R8). Por el contrario, en los tratamientos de choque osmótico iónico con NaCl, KCl, Na_2SO_4 , o K_2SO_4 , el marchitamiento fue sólo transitorio (Tabla R7) y las plantas llegaron a recuperar el aspecto inicial al tratamiento (Figura R22 y películas R1 y R2) adicionalmente, la máxima pérdida de agua detectada en 24 h fue de tan solo el 16%. El contenido en Na^+ de las plantas que mostraron un marchitamiento transitorio se incrementó de forma notable (Tabla R6) por lo que se deduce que el Na^+ y un contra-ión redujeron el potencial osmótico del agua del tejido. Las plantas en Na/MES se marchitaron y perdieron agua al igual que las plantas en sorbitol lo que quiere decir que el contra-ión no es endógeno y debe estar presente en el medio externo y serían Cl^- , SO_4^{2-} y NO_3^- en nuestros ensayos. Un razonamiento similar se puede hacer respecto al catión, el cual no puede ser endógeno porque las plantas en NMDG/Cl exhibieron también un marchitamiento permanente. Respuestas transitorias como las descritas en *Arabidopsis* también se han observado en las raíces de maíz (Frensch and Hsiao, 1994), y marchitamientos transitorios en hojas también ha sido descrito en plantas de tomate en

condiciones de salinidad (Slatyer, 1961). De estos resultados se puede concluir que cuando *Arabidopsis* se expone a condiciones de alta salinidad, se produce una respuesta fisiológica de ajuste osmótico con Na^+ , aunque el Na^+ que se acumule llegue a ser tóxico a largo plazo y la planta acabe por morir.

Los resultados descritos respaldan la idea de que el Na^+ es un “nutriente funcional” (Subbarao et al., 2003) en plantas de *Arabidopsis* expuestas a un estrés salino por lo que referirse a la entrada de Na^+ en condiciones salinas con la expresión ‘toxic Na^+ influx’ (Davenport and Tester, 2000; Kronzucker and Britto, 2011) quizá no sea adecuado pues resalta los efectos tóxicos, que son muy variables entre accesiones, y devalúa la función osmótica. Sustituir la idea que considera la entrada de Na^+ como tóxica y mediada por transportadores inespecíficos por una noción que considere la entrada de Na^+ en salinidad como funcional y mediada por transportadores específicos podría resultar crítico a la hora de desarrollar cultivos tolerantes a la salinidad. De este modo un ajuste osmótico con Na^+ podría acarrear toxicidad por Na^+ mientras que una extrusión eficaz de Na^+ podría ser una solución para mejorar la tolerancia sódica (Shi et al., 2003; Kong et al., 2008; Jacobs et al., 2011; Yue et al., 2012) pero al precio de incrementar en muchos casos un estrés osmótico. Para mejorar la tolerancia a la salinidad sin reducir la acumulación de Na^+ será necesario mejorar la tolerancia tisular (Cuin et al., 2009; Roy et al., 2014; Munns et al., 2016). Estudiar más a fondo la genética de esta importante característica es posible en *Arabidopsis*, gracias a la gran variabilidad en tolerancia tisular que muestra entre las diferentes accesiones.

4.2.3 Un efecto inhibitor de origen desconocido

En todas las accesiones estudiadas, concentraciones no muy altas de NaCl (60 – 80 mM) o de NaCl más KCl (p.e., 50 mM de NaCl y 10 mM de KCl) producen un efecto inhibitor constante, que, como ya se ha dicho, no se debe a la toxicidad de Na^+ ni a un déficit hídrico. Para este efecto desconocido es razonable asumir que procede de dentro de la planta y no de fuera. Una acumulación excesiva de iones podría desencadenar esta inhibición, por interferencia con la conductancia estomática (Maggio et al., 2007) o por sobreacumulación de osmolitos (Na^+ más K^+) (Maggio et al., 2002) o podría generar concentraciones tóxicas en el balance de otros iones (Genc et al., 2016). No obstante, una hipótesis más plausible es una ruta de señalización general de defensa del estrés que

termine desencadenando una disminución de la velocidad del crecimiento (Dolferus, 2014). Esta respuesta podría estar mediada por las proteínas DELLA y modulada por varias fitohormonas (Achard et al., 2006).

4.3 Análisis funcional y genético de la entrada de Na^+ en *Arabidopsis*.

4.3.1 Caracterización fisiológica de la entrada de Na^+ en *Arabidopsis*

Otro de los objetivos de la tesis ha consistido en el estudio de la entrada de Na^+ en la raíz. En este trabajo hemos descubierto que una importante vía de entrada y acumulación de Na^+ en *Arabidopsis* depende de nitrato. Esta dependencia no es exclusiva de este anión, ya que cloruro, sulfato y fosfato también estimulan la entrada de Na^+ , aunque con mucha menor eficacia. A 20 mM NaCl y a tiempos cortos de ensayo (cuatro horas), el cloruro tenía un papel secundario al nitrato (Figura R27C) mientras que a 200 mM NaCl y tiempos más largos (veinticuatro horas), cloruro y sulfato funcionaron igual que nitrato en términos de acumulación de Na^+ (Figura R22; Tabla R7; Películas R1 y R2).

También se ha observado una acumulación de Na^+ en la planta que es independiente de nitrato (Figuras R27 R28) y cuya translocación de Na^+ al xilema llega a saturarse al aumentar la concentración de Na^+ en forma de Na/MES (Figura R31). La vía independiente de nitrato podría estar mediada por transportadores específicos desconocidos hasta el momento o por los NSCCs (Demidchik et al., 2002; Demidchik and Maathuis, 2007) cuya identificación no está resuelta

En plantas *hkt1*, que carecen del sistema de recuperación del Na^+ del xilema hacia las células del parénquima xilemático (Berthomieu et al., 2003; Rus et al., 2004; Davenport et al., 2007;), la velocidad de acumulación de Na^+ en la parte aérea fue rápida, de aproximadamente 200 nmol mg^{-1} PS raíz h^{-1} en 20 mM NaNO_3 (calculada a partir de la tabla R12), mientras que la raíz mantuvo niveles de Na^+ bajos, 43 nmol mg^{-1} PS raíz (Tabla R12). Adicionalmente, en *Arabidopsis* se ha descrito que el reciclaje de Na^+ desde la parte aérea a la raíz a través del floema, es insignificante (Davenport et al., 2007). En consecuencia, en nuestras condiciones, la acumulación de Na^+ en la parte aérea de plantas *hkt1* se puede considerar prácticamente igual al flujo unidireccional de Na^+ al xilema.

La acumulación de Na^+ en la parte aérea de las plantas depende de dos procesos de transporte a través de membranas plasmáticas que ocurren en serie: la toma de Na^+ del medio externo a través de las células de la epidermis radicular, y la carga del Na^+ al xilema a través de las células del parénquima xilemático. En cualquier caso, todo el Na^+ que se acumula en la planta, en raíz y roseta, entra por la raíz a través del primero de ambos procesos. Así, el incremento en la acumulación de Na^+ en plantas *hkt1* a una concentración de Na^+ constante de 20 mM y concentraciones crecientes de suplementos de nitrato desde 0,5 a 20 mM nitrato (Figura R28) indicaba que el nitrato estimula la velocidad de entrada de Na^+ en la raíz. De igual manera, todo el Na^+ acumulado en la parte aérea de la planta tiene que ser previamente cargado al xilema y en las plantas *hkt1*, la progresiva acumulación de Na^+ en la parte aérea en función de la concentración externa de nitrato, ocurría sin que hubiera cambios notables en el contenido en Na^+ de la raíz. Esto indica que el nitrato también estimula la carga de Na^+ al xilema.

Los experimentos con plantas silvestres *SOS1* y mutantes *sos1* (Figura R32) nos llevan a la misma conclusión, es decir, que el nitrato mejora la transferencia de Na^+ desde la raíz a la parte aérea. También los ensayos con accesiones nos dirigen a la misma idea (Figura R33). Por último, observamos que al incrementar la concentración de Na/MES de 20 a 60 mM, aumentó el Na^+ de la raíz y el Na^+ absorbido, pero no el de la parte aérea ni el translocado (Figura R31), mientras que sustituir parcialmente el MES por nitrato incrementó el contenido en Na^+ en la parte aérea y el Na^+ translocado (Figuras R31B y R31C). Estos resultados indican que el nitrato activa la carga del Na^+ al xilema. Por tanto, nosotros planteamos un modelo donde dos sistemas de transporte nitrato-dependientes trabajan en serie tomando Na^+ del medio y cargándolo al xilema. Este sistema constituiría la vía dependiente de nitrato de acumulación de Na^+ en la parte aérea en Arabidopsis. La función de carga de Na^+ en el xilema de este sistema funcionaría en paralelo a la actividad de carga de Na^+ en el xilema desarrollada por *SOS1* la cual es independiente de nitrato. No podemos comparar la eficiencia entre los dos sistemas de carga de Na^+ al xilema (*SOS1* y el sistema dependiente de nitrato) ya que *SOS1* además de cargar Na^+ en el xilema aumenta la salida de Na^+ al exterior y el nitrato, además de cargar Na^+ en el xilema, aumenta la entrada de Na^+ a la raíz.

La dependencia del nitrato en la entrada de Na^+ por la raíz y su translocación al xilema parece ser una vía compleja a juzgar por la variabilidad que refleja el estudio con las diferentes accesiones de Arabidopsis donde todas las accesiones analizadas aumentan la

acumulación de Na^+ en presencia de nitrato, mostrando sin embargo, unas diferencias significativas en la distribución del Na^+ entre raíz y parte aérea (Figura R33). El hecho de que en *Eutrema*, la estimulación por nitrato y por sulfato de la entrada de Na^+ sean de igual magnitud sugiere que en cada especie o puede que en cada accesión, un anión predomine frente a otros.

La asociación entre Na^+ y nitrato en estos procesos no sorprende si pensamos que las plantas puedan usar el Na^+ como un catión osmoprotector en condiciones de salinidad porque el nitrato sería un contra-ión conveniente. De hecho, el nitrato cumple funciones osmóticas en condiciones normales (McIntyre, 1997; Cárdenas-Navarro et al., 1999; Loudet et al., 2003), aunque el cloro parece ser un anión más conveniente para plantas de tabaco (Franco-Navarro et al., 2016).

La vía de entrada de Na^+ dependiente de nitrato propuesta es consistente con otras observaciones previas, aunque en esos casos, la interacción entre el Na^+ y el nitrato se daba en sentido contrario, es decir, estimulación del transporte de nitrato mediado por Na^+ . El transporte de nitrato mediado por Na^+ , se ha descrito en las halofitas *Zostera marina* (García-Sánchez et al., 2000), *Sueda physophora* (Yuan et al., 2010), y *Salicornia europaea* (Nie et al., 2015) aunque en este último caso se trataba de un efecto indirecto. Además, el Na^+ estimula tanto la toma de nitrato (Kaburagi et al., 2014) como la translocación de nitrato desde la raíz a las hojas en *Beta vulgaris* (Kaburagi et al., 2015). El transporte de Na^+ dependiente de nitrato descrito en este trabajo podría estar mediado por transportadores que hayan evolucionado específicamente para cotransportar Na^+ y nitrato. Por otro lado, una hipótesis alternativa sería que el Na^+ entra en la planta a través de canales catiónicos no selectivos, NSCCs (Demidchik et al., 2002; Demidchik and Maathuis, 2007) y que el nitrato como contra-ión, se acumula mediante los sistemas nutricionales de captura de nitrato. Sin embargo, la evidencia de que los NSCCs median la entrada de Na^+ ha sido cuestionada (Kronzucker and Britto, 2011). Es más, nuestra cinética de entrada de Na^+ dependiente de nitrato a concentraciones de Na^+ constantes (Figura R28C) descarta que el Na^+ entre a través de algún canal desconocido en paralelo con la entrada del nitrato a través de los sistemas nutricionales de toma de nitrato. Porque, si este fuera el caso, la velocidad en nuestra entrada de Na^+ nitrato-dependiente estaría limitada por la velocidad de entrada de nitrato, ya que para que se neutralicen las cargas ambos iones deberían entrar a la misma velocidad, y ambas cinéticas tendrían que

asemejarse, cosa que no ocurre. Nuestra entrada de Na^+ dependiente de nitrato muestra una cinética saturante con $K_m \approx 2.5 \text{ mM NO}_3^-$ (Figura R28C) mientras que la entrada de nitrato muestra una cinética lineal, de primer orden (Touraine and Glass, 1997; Crawford and Glass, 1998; Glass and Kotur, 2013). Recientemente, se ha descrito la acuaporina *AtPIP2;1* como un NSCC que puede mediar la entrada de Na^+ en la raíz (Byrt et al., 2017), sin embargo, el bloqueo producido por Ca^{2+} en la actividad de esta proteína descarta que sea el transportador que media la entrada descrita en este trabajo, el cual muestra una baja dependencia de Ca^{2+} (Figura R30).

Los experimentos con los mutantes *nrt1.1* y *nrt1.2* añaden evidencias contrarias a la posibilidad de que la velocidad de entrada de nitrato limite la velocidad de entrada de Na^+ . En plantas de *Arabidopsis* creciendo en nitrato, la toma de nitrato apenas se ve afectada por la mutación *chl1-5* (*nrt1.1*) (Touraine and Glass, 1997), la cual por el contrario reduce la toma de Na^+ dependiente de nitrato (Figuras R34 y R35). Un razonamiento parecido podría hacerse sobre la ausencia de efecto de la mutación *nrt1.2* en la entrada de Na^+ . El gen *NRT1.2* tiene una expresión constitutiva (Huang et al., 1999; Okamoto et al., 2003) y domina la entrada de nitrato de baja afinidad (Nacry et al., 2013). Por tanto, las plantas *nrt1.2* deberían haber mostrado una inhibición en la entrada de Na^+ dependiente de nitrato, cosa que no ocurre (Figura R34; Figura R35).

La mejor explicación para nuestros resultados es que o bien NRT1.1 es uno de los varios componentes del sistema de transporte de Na^+ dependiente de nitrato o es su función como proteína reguladora sobre el actual transportador la que afecta la entrada de Na^+ en plantas *nrt1.1*. (Ho et al., 2009; Wang et al., 2012; Krapp et al., 2014). En cualquier caso, la demostración de que Na^+ y nitrato se cotransportan requiere la identificación del transportador y su posterior caracterización fisiológica y molecular.

Como ya se ha comentado, el cotransporte de Na^+ y nitrato se ha descrito en *Z. marina* (García-Sánchez et al., 2000) y también se ha propuesto para *S. physophora* (Yuan et al., 2010). Aunque el transportador involucrado no haya sido identificado, este mecanismo podría haberse extendido durante la evolución a plantas terrestres en otras circunstancias como alternativa al simporte nitrato-protón (Parker and Newstead, 2014). Un transportador de nitrato de estas características podría pertenecer a cualquiera de las familias de los transportadores de nitrato que se han descrito (von Wittgenstein et al.,

2014). Podría además ser capaz de transportar cloruro, una característica de dos miembros de esas familias, NPF2.4 (Li et al., 2016a) y and NPF2.5 (Li et al., 2017). El transporte de nitrato desde la raíz a la parte aérea está mediado en *Arabidopsis* por los transportadores NRT1.5 (NPF7.3) y NPF2.3 (O'Brien et al., 2016). Se ha descrito la significativa implicación del NRT1.5 en la translocación de nitrato a la parte aérea en condiciones de salinidad (H. Li et al., 2017; Taochy et al., 2015). En nuestros resultados del análisis transcriptómico con 20 mM Na⁺ / 4 h, hemos observado cómo NRT1.5 se regula negativamente en presencia de Na⁺, ya sea en forma de NaNO₃ ó Na/MES (Tablas, R14 y R15; Figura R44), mientras que el NPF2.3 se regula negativamente en la comparativa entre las condiciones NaNO₃vsNa/MES (Tabla R14; Figura R43A). Sin embargo, en nuestro análisis de las plantas mutantes *nrt1.5*, observamos un comportamiento similar en la acumulación de Na⁺ al de su fondo genético silvestre, por tanto, no se trata del transportador que buscamos, ni tampoco parece que participe, por lo menos en nuestras condiciones de ensayo, en la distribución de Na⁺ en Col-0.

En nuestros estudios de filogenia “*in silico*” se observa como el NRT2.5 es el único transportador de nitrato de *Arabidopsis* que presenta un residuo de fenilalanina totalmente conservado en los transportadores de nitrato de organismos de vida marina (Tabla R12), en los que el mecanismo debería ser un simporte nitrato/Na⁺. Nuestros resultados de fenotipo en sal descartan que sea el transportador de baja afinidad responsable de la entrada de Na⁺ dependiente de nitrato que buscamos, Aún así, es probable que NRT2.5 sea en *Arabidopsis* un simportador nitrato/Na⁺ de alta afinidad para nitrato que, al igual que en *Zostera* (García-Sánchez et al., 2000), puede estar presente en todas las plantas.

4.3.2 Análisis transcriptómico durante la entrada de Na⁺

Se ha observado que, en situaciones de estrés, incluyendo el estrés salino, las plantas modifican extensamente su transcriptoma (Maathuis et al., 2003). De este modo, parecía razonable pensar que la comparación del transcriptoma de la raíz entre los tratamientos de Na/MES frente a NaNO₃ podría ayudarnos en la búsqueda de los transportadores implicados en la entrada y acumulación de Na⁺ en la planta. En este sentido era muy importante seleccionar un buen medio control. El medio original de crecimiento, rico en nutrientes, entre ellos nitrato, no sería un buen control ya que queríamos comparar el efecto de Na⁺ en presencia de nitrato y en presencia de otro anión, MES, que no se

transloca al xilema. Tampoco era útil utilizar un medio rico en otras sales y nutrientes frente a un medio absolutamente deficiente en todo salvo Ca^{2+} y Na^+ (en forma NaNO_3 y Na/MES), ya que la expresión de muchos transportadores estaría significativamente alterada entre el medio control y los tratamientos por un motivo absolutamente independientemente a la presencia de Na^+ . En este sentido descartamos también incluir K^+ en el control al igual que en los tratamientos considerando que, aunque existiera una señal de deficiencia de K^+ en la planta, ésta sería la misma entre todas las condiciones y un ayuno de 4 horas no resultaría en una dramática pérdida del K^+ de la raíz como se observa en las medidas de contenido de K^+ en raíz y parte aérea para Col-0 en medio de crecimiento suplementado con 1mM KCl y los tratamientos sin K^+ (Figura R47). De esta forma, nuestro medio control resultó el más sencillo para poder interpretar el transcriptoma de la raíz en nuestras condiciones de ensayo. Por otro lado, la selección de Col-0 frente al mutante *hkt1-4* se hizo en base tanto a la capacidad de acumulación de Na^+ en la raíz del genotipo silvestre frente al mutante como a nuestro conocimiento previo del efecto de NaNO_3 y Na/MES en la acumulación del Na^+ en Col-0 (Figuras R32, R33 y R34)

Existen numerosos trabajos sobre análisis transcriptómicos de la respuesta de la planta al nitrato: en raíces de tomate (Wang et al., 2001), en raíces de Arabidopsis (Wang et al., 2000, 2003), no obstante, en todos los casos encontrados en la literatura el aporte de nitrato siempre se efectuó como KNO_3 por lo que para cualquier comparación, sólo podemos tener en cuenta resultados que se refieran a presencia o déficit de nitrato. Por otra parte, aunque existe un numero representativo de análisis transcriptómicos globales de respuesta a sal en Arabidopsis (Kreps et al., 2002; Maathuis et al., 2003; Jiang et al., 2006; Ma et al., 2006; Kilian et al., 2007; Taji et al., 2010) por el momento, no hay ningún ensayo que haya utilizado suplementos de Na^+ en una forma diferente al NaCl y a una concentración tan baja como en nuestros ensayos. Los ensayos citados difieren entre sí en la metodología, el tiempo de ensayo y la concentración de NaCl que utilizan que, en todos los casos es superior a 80 mM: **Kreps**, 100 mM NaCl a 3h y 27h; **Maathuis**, 80 mM NaCl a 2h, 5h, 10h 24h y 96h; **Ma**, 150 mM NaCl a 3h y 24h; **Jiang**, 150 mM a 6h, 24h y 48h; **Kilian**, 150 mM NaCl a 30 min, 1h, 3h, 6h, 12 y 24h y Taji, 250 mM NaCl a 2h.

El análisis transcriptómico de nuestros triplicados de las muestras reveló una expresión diferencial de aproximadamente 600/650 genes (GED) en cada una de las comparativas entre condiciones (Figura R39). Esto quiere decir que aproximadamente un 2.2% de los genes anotados en *Arabidopsis* modifican su expresión de forma diferencial tras 4 h en los diferentes tratamientos descritos, lo cual a nuestro parecer es relevante ya que dichos tratamientos sólo difieren con respecto al control en la presencia de 20 mM Na⁺ ya sea en forma de Na/MES o NaNO₃. Llama la atención que el aporte de Na⁺ en forma de NaNO₃ reprime aproximadamente un 13% más genes que el aporte de Na⁺ en forma de Na/MES.

En el análisis de enriquecimiento de términos de ontología de genes, el proceso biológico más enriquecido fue el transporte de iones (Figura R40), indicando que existe una regulación por Na⁺ de sistemas de transporte a nivel transcripcional. De los 1279 genes que determinan sistemas de transporte en *Arabidopsis*, alrededor de 50 fueron identificados entre los GEDs en cada comparativa entre condiciones ensayadas (Figura R41), lo que supone en números redondos que un 7% de los GEDs determinan sistemas de transporte. También entre estos GEDs hay un porcentaje significativamente mayor de genes reprimidos que inducidos (65% frente a un 35% respectivamente) en la condición NaNO₃ frente a control. Esta observación es consistente con estudios transcriptómicos de ayuno de nitrato en raíces de arroz (Yang et al., 2015) donde entre los GEDs entre condiciones de suficiente nitrato frente a déficit de nitrato había un 56% reprimidos y un 44% inducidos.

Nuestros datos dejan claro que la respuesta transcriptómica a la sal varía dependiendo del anión que acompañe al Na⁺ ya que el solapamiento de genes expresados diferencialmente en las comparativas entre los tratamientos NaNO₃vsControl y Na/MESvsControl no llega al 20% (Figura R42). Entre los GEDs que determinan transportadores en el conjunto solapado (Figura R42B), hay cinco que se inducen por Na⁺ como ya había descrito (Ma et al., 2006). También (Jiang et al., 2006) y (Kilian et al., 2007) describieron una inducción en respuesta a Na⁺ de la expresión de SULTR3;1 y NRT1.8, mientras que (Maathuis et al., 2003) hizo lo propio con ACA13 y NRT1.8. Además, hay once GEDs que se reprimen en respuesta al Na⁺ sin importar el anión presente, varios de los cuales se reprimen también en otros análisis: NRT1.5, UMAMIT17 en (Jiang et al., 2006; Kilian et al., 2007) y el transportador de tetraciclina (AT2G16990) en (Ma et al., 2006). Podemos

afirmar, que hay una respuesta transcriptómica relativamente temprana al Na^+ , que es independiente del anión que lo acompañe y que para algunos transportadores puede comenzar a concentraciones de Na^+ relativamente bajas como 20 mM. Por otro lado, también existe una respuesta transcriptómica a la sal asociada con la presencia de nitrato ó MES asociados al Na^+ .

4.3.2.1 Selección de genes para el estudio fenotípico de sus mutantes

La manera de averiguar si alguno de los GEDs identificados en el estudio transcripcional que determinaban transportadores contribuía de forma significativa al transporte de Na^+ (Tabla R15), ha sido estudiando la entrada de Na^+ en los mutantes de Arabidopsis seleccionados, con intención de comprobar si en dichos mutantes cambiaba de forma significativa la acumulación de Na^+ respecto al genotipo silvestre. Los criterios de selección de los transportadores estudiados fueron: (i) aquellos pertenecientes a la familia de transportadores de nitrato o relacionados, ya que podrían estar implicados en la entrada de Na^+ dependiente de nitrato; (ii) otros transportadores descritos como transportadores de aniones que pudieran co-transportar Na^+ como contra-ión; (iii) transportadores conocidos de K^+ que pudieran transportar Na^+ sustituyendo al K^+ . Es razonable pensar que los posibles candidatos a mediar la entrada de Na^+ deberían inducirse en las condiciones ensayadas, sin embargo, y por no perder algún candidato interesante, el estudio fenotípico de mutantes se extendió a aquellos transportadores que cumplieran alguno de los criterios arriba mencionados, independientemente de se indujeran o reprimieran en nuestras condiciones de ensayo.

En la búsqueda del transportador implicado en la entrada de Na^+ , analizamos en primer lugar los GEDs que determinaban transportadores de nitrato. Estos se expresan siguiendo un claro patrón: represión con nitrato e inducción con MES (Figuras R43A y R43B; Tabla R14), salvo en los casos del NRT1.8 y el del NRT1.5 que, como ya hemos mencionado antes, se induce y reprime respectivamente en presencia de Na^+ , en lo que parece ser una respuesta de la planta al estrés sódico. Estos dos transportadores presentan este mismo patrón opuesto de regulación de la expresión por otros estreses como Cd^{2+} , frío, metales pesados o estrés biótico (Li et al., 2010; Chen et al., 2012) por lo que podrían participar en la respuesta general al estrés de la planta. Se ha descrito recientemente que NRT1.5 participa en la una homeostasis de K^+ dependiente de nitrato (Drechsler et al., 2015),

donde se sugiere que el transportador de baja afinidad de nitrato NRT1.5 se encargaría de translocar K^+ al xilema. Este es un ejemplo de nuevas funciones de transporte en conocidos transportadores que hasta ahora estaban catalogados como nitrato/ H^+ simportadores.

En el estudio fenotípico de mutantes de *Arabidopsis* también incluimos los transportadores NRT2.4, NRT2.5 y NRT2.6, todos ellos hasta ahora propuestos como transportadores de nitrato de alta afinidad. En nuestras condiciones hemos observado una inhibición en la expresión de todos ellos al comparar $NaNO_3$ frente a Na/MES (Tabla R14).

Otro gen que seleccionamos para el estudio fenotípico de su mutante fue el que determina a SLAH2 (Tabla R15). Pertenecce a la familia de los transportadores homólogos a SLAC1. Se ha caracterizado como un transportador de nitrato impermeable al Cl^- (Maierhofer et al., 2014) y en nuestros ensayos, su expresión se induce en presencia de $NaNO_3$.

Como ya hemos mencionado, nos hemos fijado también en la expresión de genes que determinan transportadores de aniones distintos al nitrato. En condiciones de déficit de nutrientes parece razonable que se estimule la expresión de los transportadores encargados de la reposición de dichos nutrientes. En nuestro caso, esto podría ocurrir con los transportadores de nitrato, fosfato, sulfato, boro, cloro y K^+ . Sin embargo, como hemos argumentado antes, este aumento en la expresión debería ocurrir en todos nuestros tratamientos, los cuales tienen el mismo déficit de nutrientes. Así, un aumento en la expresión en algún transportador de estas características en presencia de $NaNO_3$ pero no en Na/MES , estaría indicando una expresión nitrato-dependiente y por tanto, serían candidatos a mediar la entrada de Na^+ dependiente de nitrato. En nuestro ensayo, los genes que determinan transportadores de sulfato SULTR1;2 y SULTR3.5 y de boro BOR1 (Boron transporter) inducen su expresión en presencia de $NaNO_3$ y no de Na/MES (Tabla R15). En cebada, se ha descrito que la presencia de nitrato en plantas ayunadas de nitrato, aumenta tanto la expresión génica de un transportador de alta afinidad de sulfato como la toma de sulfato por la planta (Vidmar et al., 1999). Además, una disminución en el transporte de nitrato disminuye el transporte de sulfato (Clarkson et al., 1989). Parece, pues, que existe una relación entre los metabolismos de sulfato y nitrato. Sin embargo, no se conoce ningún transportador de sulfato que medie el transporte de Na^+ . BOR1, parece estar implicado en el transporte de boro hacia el xilema en *Arabidopsis* (Takano et al., 2002) y, aunque hay suficientes trabajos que relacionan la respuesta al $NaCl$ y al boro en

trigo (Wimmer et al., 2012), brócoli (Smith et al., 2013) y maíz (Huanca-Mamani et al., 2018), no hay descrito un intercambiador boro/ Na^+ .

Los últimos dos genes que hemos escogido para realizar análisis fenotípico en sus correspondientes mutantes son los sistemas de transporte de K^+ *HAK5* y *SKOR*. Ambos constituyen dos de los principales sistemas de toma y translocación de K^+ respectivamente en *Arabidopsis*. *HAK5* funciona como transportador de alta afinidad en la entrada de K^+ en la raíz (Aleman et al., 2011). Diversos trabajos han descrito que el ayuno de K^+ incrementa los niveles de expresión de *AtHAK5* (Armengaud, 2004; Britto and Kronzucker, 2008) y que la presencia de Na^+ reduce los niveles de mensajero (Nieves-Cordones et al., 2010). Además, se ha sugerido que estos cambios en la expresión de *AtHAK5* puedan estar mediados por cambios en la polarización de la membrana plasmática (Aleman et al., 2011) donde el ayuno de K^+ hiperpolarizaría la membrana y la presencia de Na^+ la despolarizaría. Adicionalmente, los niveles de expresión de *HAK5* aumentan en respuesta a déficit de nitrato en tomate (Wang et al., 2001) y en *Arabidopsis* (Shin et al., 2005). En nuestro análisis, *HAK5* induce su expresión en NaNO_3 y Na/MES , por lo que parece que es la presencia de Na^+ la que produce el aumento en la expresión.

Finalmente, *SKOR* es un canal de K^+ dependiente de voltaje localizado en las células de la estela de la raíz y que media el transporte de K^+ a la parte aérea (Wegner and De Boer, 1997; Gaymard et al., 1998). Se ha propuesto como canal impermeable al Na^+ y cuyos niveles de transcripción disminuyen en déficit de K^+ (Maathuis et al., 2003). En nuestros resultados, la expresión de *SKOR* se indujo en la comparativa entre la NaNO_3 y Na/MES por lo que fue seleccionado para su estudio fenotípico.

Nosotros pensamos que el Na^+ tiene una funcionalidad osmótica y su entrada y distribución en la planta acoplada a la del NO_3 , podría estar mediada directa o indirectamente por alguno de estos sistemas de transporte mencionados o por otros que, aunque no se han escogido inicialmente para la conclusión de esta tesis sí podrían ser analizados en un futuro. No obstante, la complicada red de señalización y comunicación cruzada asociada a la homeostasis nutricional (Ródenas et al., 2017) dificulta una interpretación general de lo que está ocurriendo en planta. Para ello el análisis del fenotipo en los mutantes puede simplificar el estudio en el sentido que ofrece una respuesta fisiológica a condiciones determinadas.

Los mutantes de ninguno de los genes que determinan transportadores de nitrato analizados mostraron un fenotipo diferente al del genotipo silvestre ensayado en paralelo (Figura R45). En cuanto a los genes que determinan otros transportadores que no son de la familia de los transportadores de nitrato, en sólo dos de los mutantes encontramos diferencias estadísticamente significativas en comparación con su correspondiente genotipo silvestre. Curiosamente, ambos son transportadores de K^+ . En *hak5*, observamos una disminución pequeña, pero estadísticamente significativa en la concentración de Na^+ respecto al genotipo silvestre Col-0 para la condición Na/MES (Figura R46D). En *skor*, la disrupción del gen produjo una disminución importante en los niveles de K^+ en la parte aérea de la planta, pero no en la raíz, tal como ya se ha descrito (Gaymard et al., 1998). Sin embargo, el efecto mayor de la mutación *skor* se observó sobre el Na^+ , el cual aumentó significativamente su concentración en la parte aérea en todos los tratamientos y disminuyó significativamente en raíz en los tratamientos con nitrato (Figuras R47A y R47B). Este efecto no parece depender de la concentración de K^+ interna de plantas *skor* que es similar a la del genotipo silvestre tanto en raíz como en parte aérea en tratamientos sin K^+ externo, con K^+ externo 2 mM o en el medio nutritivo de crecimiento que tiene 1 mM KCl.

En los mutantes *skor*, las diferencias con el genotipo silvestre han sido muy notables, tanto en Na/MES como en $NaNO_3$ (Figura R47), aumentando tanto la absorción de Na^+ como la translocación a la parte aérea (Figura R48). Conciliar este resultado para un canal específico de K^+ es difícil, sin embargo, podemos lanzar algunas hipótesis al respecto. La primera, implicaría la reabsorción de Na^+ presente en el xilema hacia las células del parénquima a través del canal SKOR abierto. No sabemos cuánto Na^+ hay en el xilema de Arabidopsis en las condiciones de nuestro ensayo, pero podemos hipotetizar que no es muy alto, quizás 5 mM. Tampoco sabemos cuánto Na^+ hay en el citoplasma de las células del parénquima, pero, de nuevo, no debería ser muy alto, probablemente menos de 20 mM. En esas condiciones el potencial de equilibrio del Na^+ (E_{Na^+}) estaría entre 30-40 mV (negativo dentro), probablemente el potencial real es aún más negativo. Si SKOR está abierto, el Na^+ pasaría del xilema al parénquima xilemático. En resumen, el Na^+ entraría a la raíz aunque SKOR esté diseñado para que el K^+ salga al xilema. En esas condiciones, la pérdida de SKOR aumentaría el Na^+ en la parte aérea y disminuiría el Na^+ en la raíz. Esta hipótesis implicaría que SKOR fuese permeable al Na^+ , cosa que como hemos

mencionado anteriormente está excluida en los experimentos realizados hasta ahora. No obstante, pensamos que las condiciones tan particulares de nuestros ensayos, donde las células no han estado expuestas al Na^+ hasta el momento de experimento, en el que además, durante 4 horas se las ha ayunado del resto de nutrientes, puedan haber configurado un sistema experimental que muestre esa característica antes no detectada por parte de SKOR, el cual ha sido caracterizado en estudios muy válidos y rigurosos pero que de partida podrían no haber tenido las condiciones necesarias para la detección de este transporte. Además, se ha podido determinar que SKOR es permeable a otros cationes como el Ca^{2+} (Wegner and De Boer, 1997), y se sabe que otros miembros de la familia de los canales rectificadores de salida de K^+ , los NORC (Nonselective Outward Rectifying Cation) del parénquima xilemático son permeables tanto a Na^+ como a K^+ además de al Ca^{2+} (Anschütz et al., 2014).

La segunda hipótesis implicaría que la falta de SKOR (se anula el flujo de una carga positiva) se traduciría en una membrana ligeramente despolarizada con respecto a la plantas control. Esta despolarización podría compensarse incrementando la carga de Na^+ en el xilema por algún mecanismo ahora desconocido. Estas dos hipótesis tienen puntos conflictivos, en la primera, que parece bien establecido que SKOR no es permeable al Na^+ (Gaymard et al., 1998) y en la segunda, la noción de que el potencial de membrana de la célula vegetal estaría dominado por flujos de K^+ como ocurre en las células animales en vez de por la ATPasa de H^+ .

Ciertamente son dos hipótesis complejas y lo primero que habría que hacer es descartar que el mutante *skor* tenga desregulada la expresión de transportadores importantes implicados en la distribución de Na^+ como *sos1* y *hkt1*. Si este no fuera el caso, habría que medir el potencial de membrana de las células del parénquima xilemático y las concentraciones de Na^+ y K^+ exudado del xilema. Finalmente, la expresión heteróloga en oocitos con protocolos modificados pueda elucidar de qué manera participa SKOR en la distribución de Na^+ en la planta de Arabidopsis.

En cuanto al resto de transportadores identificados en nuestro análisis transcriptómico, la ausencia de diferencias entre las líneas mutantes analizadas y su correspondiente silvestre no descarta por completo su implicación en el proceso de entrada de Na^+ dependiente o independiente de nitrato. Después de todo, es razonable asumir que los cambios en los

niveles de transcritos detectados, tengan un reflejo en la actividad de dichos transportadores. De hecho, nuestro análisis transcriptómico sugiere la existencia de cambios en la actividad de múltiples transportadores, por lo que la pérdida de actividad de sólo uno de ellos podría no tener un gran reflejo en el patrón de acumulación de Na^+ si su contribución es pequeña. Lo que sí podríamos concluir es que estos transportadores no juegan un papel dominante en la acumulación de Na^+ . Finalmente, no podemos descartar que el transportador que buscamos no se encuentre regulado transcripcionalmente pero sea activo en nuestras condiciones de ensayo.

4.4 Acumulación de Na^+ en Eutrema

En nuestros ensayos, el crecimiento de plantas de *E. salsugineum* no se vio afectado de forma significativa a concentraciones de NaCl de 100 mM o inferiores, lo que está de acuerdo con estudios previos (Volkov et al., 2003; Alemán et al., 2009). El peso seco de la roseta de Eutrema comenzó a reducirse de forma significativa, un 28% respecto a las condiciones control, tras dos semanas de exposición a una concentración en torno a los 120 mM NaCl (Figura R49) y a 160 mM esa inhibición alcanzó el 40% de reducción del peso seco de la roseta (Figura R49). El silenciamiento en la expresión de SOS1 por RNAi, aumentó la inhibición en el crecimiento de la roseta, que redujo su peso seco un 35% respecto a las condiciones control a 80 mM NaCl; la reducción fue de un 40% a 120 mM y de un 59% a 160 mM NaCl. Estos datos también están de acuerdo con trabajos previos que analizaron el efecto del silenciamiento de *SOS1* sobre el crecimiento de Eutrema (Oh et al., 2009), si bien, la metodología es muy diferente entre ambos estudios.

Al comparar la condición de ensayo 1-120 (KCl + NaCl) mM con la condición 15-105 (KCl + NaCl) mM tanto en el silvestre como en la línea silenciada (Figura R53), se observó que el aumento en el K^+ externo del medio conllevaba una disminución significativa de la ratio Na^+/K^+ interna por la disminución del contenido en Na^+ en raíz y parte aérea. Sin embargo, en ninguno de los dos genotipos, el crecimiento de raíz o parte aérea mejoró, sugiriendo que la inhibición en el crecimiento en Eutrema en respuesta a NaCl es independiente de las ratios Na^+/K^+ , igual que ocurre en Arabidopsis.

El silenciamiento de la expresión *EsSOS1* aumentó las ratios Na^+/K^+ en la raíz en todas las condiciones ensayadas (Figuras R51 y R53 Raíz), y también aumentó la concentración

interna de Na^+ respecto al genotipo silvestre (Figura R53, plantas cuyas raíces pudieron pesarse). Este aumento en el Na^+ de la raíz en plantas con la expresión de *EsSOS1* silenciada ya se había descrito en experimentos de cuantificación de Na^+ por fluorescencia con CoroNa Green (Oh et al., 2009). Respecto a la parte aérea, a diferencia de lo que ocurre en el mutante *sos1* de *Arabidopsis* no hay una mayor acumulación de Na^+ en la línea silenciada respecto a la silvestre. Por el contrario, la ratio Na^+/K^+ en la parte aérea de las líneas silenciadas es notablemente menor y eso es debido al aumento en el contenido de K^+ de IR-*EsSOS1* respecto al genotipo control (Figuras R52 y R53 Parte Aérea). Esta observación, no se ha visto para nuestras plantas *Atsos1* en condiciones inhibitorias (Tabla R4) ni en ningún estudio anterior, ya sea con *Arabidopsis* o con *Eutrema*. Los únicos datos sobre contenido en Na^+ y K^+ en líneas *EsSOS1* silenciadas respecto al genotipo control muestran un contenido en Na^+ variable con diferencias que son estadísticamente significativas durante el tiempo del ensayo, a la vez que sucede un mantenimiento en el contenido de K^+ (Oh et al., 2009).

Ante estos resultados resulta lógico plantear la posibilidad de que SOS1 de *Eutrema* pueda comportarse como un antiportador Na^+/K^+ de modo que, en condiciones de alta salinidad, alivie la alta concentración de Na^+ mediando el intercambio Na^+/K^+ . Esto no resulta del todo improbable ya que conocemos la existencia de otros sistemas de transporte en *Eutrema* que parecen alterar la selectividad Na^+ frente a K^+ . Por ejemplo, se ha demostrado que *E. salsugineum* expresa dos transportadores de familia HKT1. *EsHKT1;2* muestra especificidad por K^+ en presencia de NaCl. (Ali et al., 2012). Cuando utilizamos Rb^+ como análogo de K^+ pudimos corroborar un aumento en el contenido de Rb^+ en la raíz de plantas IR-*EsSOS1*. Sin embargo, la interpretación de estos resultados hay que hacerla con cautela ya que hay que contemplar la posibilidad de que la interferencia en el silencimiento afecte, de forma desconocida, a algún sistema de transporte distinto de SOS1, que modificara el transporte de K^+ .

Los experimentos de caracterización funcional por expresión heteróloga en bacteria confirmaron la idea del transporte de K^+ , ya que *EsSOS1* complementó el déficit de crecimiento del mutante TKW42 a bajo K^+ (Figura R56). Estos resultados son consistentes con otros similares del transportador SOS1A de *Cymodocea nodosa* (Garcia-deblás et al., 2007), aunque con una clara diferencia en función del pH; *AtSOS1* fue activo a pH 5,5 y 7,5, y *EsSOS1* solo a pH 5,5.

También los estudios de crecimiento en la cepa mutante de levadura MA5 ($\Delta trk1$, $\Delta trk2$, $\Delta ena1-4$, $\Delta nha1$) mostraron el rescate del crecimiento a concentraciones bajas de K^+ de 0,5 mM (Figura R57). Adicionalmente, se observó un transporte de Rb^+ en las cepas MA5 y AXT3K ($\Delta ena1-4$, $\Delta nha1$, $\Delta nhx1$) ambas expresando *EsSOS1*. Aunque, estudios previos realizados con *AtSOS1* no observaron transporte de alta afinidad de K^+ en la cepa mutante WΔ3 ($\Delta trk1$, $\Delta trk2$) (Quintero et al., 2002), se ha descrito que la interrupción del homólogo *PpSOS1* de *Physcomitrella patens* inhibe la entrada de alta afinidad de K^+ en el musgo (Fraile-escanciano et al., 2010) y que otros miembros de la familia de los CPA1 como NHA1 y NHX1 sí transportan K^+ (Banuelos et al., 1998; Venema et al., 2002; Hernández et al. 2009). Es razonable por tanto pensar que, como se menciona en (Alemán et al. 2009), las halofitas pueden estar mejor provistas de sistemas de transporte que mantengan la nutrición de K^+ y la homeostasis K^+/Na^+ en condiciones de salinidad. Nuestros datos de expresión heteróloga en bacteria y levadura sugieren que *EsSOS1* participa en el transporte de K^+ , entendemos que se trata de una expresión heretóloga con la incertidumbre que ello supone porque el sistema de expresión podría responder de manera diferente a los estados de polarización de la membrana o regular de forma diferente la traducción proteica en comparación con la expresión en Eutrema. Sin embargo, nuestro fenotipo en planta es claro y sugiere firmemente que *EsSOS1* puede mediar el transporte de K^+ .

Previamente, varios trabajos habían establecido que *EsSOS1* era más eficiente que *AtSOS1* complementando el crecimiento de una cepa de levadura sensible al Na^+ a pH 6,5 (Oh et al., 2009; Jarvis et al., 2014). Nuestros experimentos de expresión heteróloga en levadura por crecimiento en gota y por crecimiento en bioscreen, confirmaron que *EsSOS1* complementaba el fenotipo de toxicidad por Na^+ en la cepa AXT3K cuando se coexpresaban los componentes de la ruta de activación SOS2 y SOS3 e indicó, además, que esa complementación dependía del pH y, en este sentido, era diferente a la de *AtSOS1* (Figuras R57 y R58). Atendiendo a la Figura R62, parece que *AtSOS1* es más efectivo que su homólogo en Eutrema sacando Na^+ de la levadura siendo capaz de mantener la ratio Na^+/K^+ por debajo de uno. *EsSOS1* por el contrario, sólo parece ser eficiente a pH ácido donde estaría favorecido el funcionamiento de SOS1 sacando Na^+ al exterior de modo que la levadura puede mantener una ratio Na^+/K^+ que le permite un buen crecimiento. Así la alcalinización del pH reduce significativamente la actividad de

EsSOS1 como antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática y también reduce el crecimiento (Figura R62) o lo retrasa notablemente (Figura R61). Sin embargo, es difícil explicar qué ocurre con *AtSOS1* a pH ácido, ya que, a pesar de tener contenidos de Na^+ similares en todos los pH, su crecimiento está significativamente impedido a bajo pH. Una hipótesis podría consistir en un cambio local en el pH interno que repercutiera en el potencial de membrana de manera que se dificultara la entrada de nutrientes, por ejemplo, K^+ y que este efecto fuese determinante para *AtSOS1* pero no para *EsSOS1*. También podríamos razonar que algunos transportadores de la levadura presentan una regulación transcripcional dependiente de pH (Causton et al., 2001) lo que podría significar que transportadores implicados en la homeostasis del pH se desregularan y esto afectara de forma diferente a ambos transportadores. Alternativamente, podría estar afectada la estequiometría del transporte, aunque de momento no se ha determinado si *AtSOS1* ó *EsSOS1* puedan ser electrogénicos. Otra hipótesis podría ser un cambio de localización del transportador inducido por pH, de manera que, a pH ácido, *AtSOS1* estuviera en la membrana plasmática y *EsSOS1* en membranas de orgánulos internos viéndose afectados de forma distinta por el estrés asociado al pH.

4.5 Perspectivas de futuro

La inmensa mayoría de nuestros cultivos son glicofitas domesticadas y conseguir cultivos más tolerantes al Na^+ ha planteado y plantea muchas dificultades para los mejoradores ya que la tolerancia de las plantas a la salinidad muestra las características de un rasgo multigénico donde la complejidad fisiológica se ve reflejada (Flowers, 2004). Esta complejidad fisiológica se refiere a efectos tóxicos sobre la raíz y la parte aérea, déficit hídrico y una inhibición en el crecimiento producida por la situación de estrés salino y, para mayor complejidad, todos estos efectos pueden operar por mecanismos dependientes.

Además de lo ya descrito y discutido, los resultados de esta tesis dejan abiertas varias líneas de trabajo cuya consecución futura podría ayudar a conseguir tanto identificar el transportador que media la entrada de Na^+ como que algunos cultivos adquirieran rasgos de halofitas:

Nuestro análisis global transcriptómico supone un valioso punto de partida a la hora de estudiar la regulación transcripcional de la entrada de Na^+ . Si el transportador implicado o los mecanismos que regulan su actividad estuviesen modulados de forma transcripcional, nuestros datos pueden ayudar a identificarlos.

Una segunda línea de trabajo se refiere a la gran diversidad en la tolerancia al Na^+ encontrada en *Arabidopsis*. Esta tolerancia refleja solo una parte de la adaptación de las halofitas, pero una parte importante. En Col-0 ratios molares de Na^+/K^+ tan bajos como 1 empiezan a dar síntomas de toxicidad en las hojas mientras que Ts-1 tolera ratios superiores a 8 sin mostrar síntomas de toxicidad. Probablemente, esta diferencia refleja capacidades muy distintas para acumular el Na^+ en la vacuola. En la actualidad disponemos de plantas F_2 que podrían servir para identificar rápidamente el gen si el carácter fuera monogénico. Si el carácter fuera poligénico, los RILs de Col-0 x C24 (en las dos direcciones parentales) podrían servir para identificar QTLs para el carácter.

Por otro lado, convendría seguir profundizando en el papel del Na^+ como osmolito principal, idea dominante en los años 60 y 70, luego perdida y que ahora se está recuperando, como ya se ha descrito. Esta función del Na^+ debe ser tomada en cuenta a la hora de desarrollar estrategias encaminadas a mejorar el crecimiento de las plantas en NaCl y no centrar exclusivamente esas estrategias en dejar el Na^+ fuera de la planta, como en las células animales.

Finalmente, la reducción del crecimiento en respuesta al NaCl en ausencia de problemas de toxicidad (Figura R18) sugiere la existencia de una señal de estrés que es necesario conocer. Sin controlar esta respuesta de nada serviría tener plantas en las que el Na^+ no sea tóxico y no haya déficit hídrico, porque estas plantas crecerían poco y serían poco productivas. Lamentablemente, esta respuesta tiene muy poca variabilidad en las accesiones que hemos estudiado, pero sí hemos observado algo de variabilidad en los RILs Col-0 x C24, lo que abre alguna perspectiva al análisis genético del carácter.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis demuestran un papel complejo del Na^+ en la respuesta de *Arabidopsis* al NaCl , como ion tóxico interno y osmótico externo y como ion osmótico interno fácil de adquirir. Esto conduce a dos tipos de conclusiones: una sobre la entrada de Na^+ en la planta y la otra sobre de la respuesta general de *Arabidopsis* a la salinidad.

Entrada de Na^+ en la planta

1. Existe una dependencia del nitrato en la toma de Na^+ por la raíz, y su translocación al xilema. Esta dependencia varía entre las accesiones y entre especies relacionadas donde otros aniones como el sulfato, podrían suplir esa función. En esta vía de acumulación de Na^+ , proponemos la existencia de dos sistemas de transporte que trabajan en serie mediando la toma de Na^+ del exterior y el paso a los vasos del xilema. Nuestros resultados muestran que en esta vía nitrato dependiente de entrada de Na^+ está implicado el transportador/regulador NRT1.1, bien mediando directamente el transporte de Na^+ o bien regulando a otro sistema.
2. Existe otra vía de acumulación de Na^+ que es independiente del nitrato y de cualquier otro anión que se transporte al xilema. En esta vía SKOR podría funcionar directamente o indirectamente.
3. El transportador SOS1 de *Eurema*, además de transportar Na^+ , podría estar implicado en el transporte de K^+ contribuyendo esta novedosa función a la mayor tolerancia de la planta. Este transportador muestra una dependencia funcional del pH diferente a la de su homólogo en *Arabidopsis*.

Respuesta general de Arabidopsis a la salinidad

4. Las plantas de Arabidopsis expuestas a concentraciones moderadas de NaCl de 60 mM que inhiben su crecimiento un 50% no muestran déficit hídrico en nuestras condiciones experimentales y sólo en algunas accesiones una parte de la inhibición del crecimiento está asociada a toxicidad por Na^+ .

5. Sin déficit hídrico y sin toxicidad, la disminución del crecimiento de las plantas de Arabidopsis a 60 mM de NaCl y, al menos, entre 20 y 80 mM NaCl, podría deberse a una respuesta general de estrés, que se convertiría en un factor importante de inhibición del crecimiento que está poco estudiado. La sobreacumulación de iones Na^+ más K^+ podría ser la señal desencadenante de esta respuesta.

6. El Na^+ juega un papel osmótico esencial permitiendo a la planta mantener un nivel hídrico adecuado incluso a concentraciones altas de NaCl. En soluciones de bajo potencial osmótico no salino, Arabidopsis no presentó adaptación osmótica. Por ello, el Na^+ debería ser considerado un nutriente funcional para Arabidopsis.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

ACHARD, Patrick, et al. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 2006, vol. 311, no 5757, p. 91-94.

ALBERTS, B, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, and P Walter. 2007. "Molecular Biology of the Cell 5th Edn (New York: Garland Science)."

ALEMÁN, Fernando, et al. The F130S point mutation in the Arabidopsis high-affinity K^+ transporter AtHAK5 increases K^+ over Na^+ and Cs^+ selectivity and confers Na^+ and Cs^+ tolerance to yeast under heterologous expression. *Frontiers in plant science*, 2014, vol. 5, p. 430.

ALEMAN, Fernando, et al. Potassium/sodium steady-state homeostasis in *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana* under long-term salinity conditions. *Plant science*, 2009, vol. 176, no 6, p. 768-774.

ALGEO, Thomas J.; SCHECKLER, Stephen E. Terrestrial-marine teleconnections in the Devonian: links between the evolution of land plants, weathering processes, and marine anoxic events. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 1998, vol. 353, no 1365, p. 113-130.

ALI, Zahir, et al. TsHKT1; 2, a HKT1 homolog from the extremophile *Arabidopsis*-relative *Thellungiella salsuginea*, shows K^+ -specificity in the presence of NaCl. *Plant Physiology*, 2012, p. pp. 111.193110.

AMTMANN, Anna. Learning from evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants. *Molecular Plant*, 2009, vol. 2, no 1, p. 3-12.

AMTMANN, Anna; SANDERS, Dale. Mechanisms of Na^+ uptake by plant cells. En *Advances in Botanical Research*. Academic Press, 1998. p. 75-112.

ANDRÉS, Zaida, et al. Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, p. 201320421.

ANSCHÜTZ, Uta; BECKER, Dirk; SHABALA, Sergey. Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *Journal of Plant Physiology*, 2014, vol. 171, no 9, p. 670-687.

APSE, Maris P., et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, vol. 285, no 5431, p. 1256-1258.

ARMENGAUD, Patrick; BREITLING, Rainer; AMTMANN, Anna. The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant physiology*, 2004, vol. 136, no 1, p. 2556-2576.

ATTIA, Hounaida, et al. Long-term effects of mild salt stress on growth, ion accumulation and superoxide dismutase expression of *Arabidopsis* rosette leaves. *Physiologia plantarum*, 2008, vol. 132, no 3, p. 293-305.

BAAUEIOS, Maria A., et al. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology*, 1998, vol. 144, no 10, p. 2749-2758.

BARRAGÁN, Verónica, et al. Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2012, p. tpc. 111.095273.

BARTELS, Dorothea; SUNKAR, Ramanjulu. Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 2005, vol. 24, no 1, p. 23-58.

BASSIL, Elias; BLUMWALD, Eduardo. The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/H⁺ transporters. *Current opinion in plant biology*, 2014, vol. 22, p. 1-6.

BAXTER, Ivan, et al. A coastal cline in sodium accumulation in *Arabidopsis thaliana* is driven by natural variation of the sodium transporter AtHKT1; 1. *PLoS genetics*, 2010, vol. 6, no 11, p. e1001193.

BENITO, Begoña, et al. Growth at high pH and sodium and potassium tolerance in media above the cytoplasmic pH depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell*, 2009, vol. 8, no 6, p. 821-829.

BENITO, Begoña; GARCIADÉBLAS, Blanca; RODRIGUEZ-NAVARRO, Alonso. HAK transporters from *Physcomitrella patens* and *Yarrowia lipolytica* mediate sodium uptake. *Plant and Cell Physiology*, 2012, vol. 53, no 6, p. 1117-1123.

BENITO, Begona, et al. Novel P-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryotic Cell*, 2004, vol. 3, no 2, p. 359-368.

BENLLOCH, M., et al. Salt sensitivity and low discrimination between potassium and sodium in bean plants. *Plant and Soil*, 1994, vol. 166, no 1, p. 117-123.

BENLLOCH, M., et al. Salt sensitivity and low discrimination between potassium and sodium in bean plants. *Plant and Soil*, 1994, vol. 166, no 1, p. 117-123.

BENNETT, T. H.; FLOWERS, T. J.; BROMHAM, Lindell. Repeated evolution of salt-tolerance in grasses. *Biology Letters*, 2013, vol. 9, no 2, p. 20130029.

BERNSTEIN, Leon. Effects of salinity and sodicity on plant growth. *Annual review of phytobiology*, 1975, vol. 13, no 1, p. 295-312.

BERNSTEIN, Leon. Osmotic adjustment of plants to saline media. I. Steady state. *American Journal of Botany*, 1961, vol. 48, no 10, p. 909-918.

BERTHOMIEU, Pierre, et al. Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na^+ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO journal*, 2003, vol. 22, no 9, p. 2004-2014.

BLUMWALD, Eduardo. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current opinion in cell biology*, 2000, vol. 12, no 4, p. 431-434.

BLUMWALD, Eduardo; AHARON, Gilad S.; APSE, Maris P. Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, vol. 1465, no 1-2, p. 140-151.

BOYER, John S. Effects of osmotic water stress on metabolic rates of cotton plants with open stomata. *Plant Physiology*, 1965, vol. 40, no 2, p. 229.

BRESSAN, Ray A., et al. Learning from the Arabidopsis experience. The next gene search paradigm. *Plant physiology*, 2001, vol. 127, no 4, p. 1354-1360.

BRETT, Christopher L., et al. The yeast endosomal Na^+ (K^+)/ H^+ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Molecular biology of the cell*, 2005, vol. 16, no 3, p. 1396-1405.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Sodium efflux in plant roots: What do we really know?. *Journal of plant physiology*, 2015, vol. 186, p. 1-12.

BRITTO, Dev T., et al. 42K analysis of sodium-induced potassium efflux in barley: mechanism and relevance to salt tolerance. *New Phytologist*, 2010, vol. 186, no 2, p. 373-384.

BRITTO, Dev T.; KRONZUCKER, Herbert J. Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. *Trends in plant science*, 2006, vol. 11, no 11, p. 529-534.

BRITTO, Dev T.; KRONZUCKER, Herbert J. Ussing's conundrum and the search for transport mechanisms in plants. *New Phytologist*, 2009, vol. 183, no 2, p. 243-246.

BRITTO, Dev T.; KRONZUCKER, Herbert J. Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum*, 2008, vol. 133, no 4, p. 637-650.

BROWNELL, Peter Ferguson. Sodium as an Essential Micronutrient Element for a Higher Plant (A triplex vesicaria). *Plant Physiology*, 1965, vol. 40, no 3, p. 460.

BROWNELL, P. F.; CROSSLAND, C. J. The requirement for sodium as a micronutrient by species having the C4 dicarboxylic photosynthetic pathway. *Plant Physiology*, 1972, vol. 49, no 5, p. 794-797.

BRUNELLI, Joseph P.; PALL, Martin L. A series of yeast/*Escherichia coli* λ expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and cre/lox-mediated plasmid excision. *Yeast*, 1993, vol. 9, no 12, p. 1309-1318.

BUESCHER, Elizabeth, et al. Natural genetic variation in selected populations of *Arabidopsis thaliana* is associated with ionic differences. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no 6, p. e11081.

BYRT, Caitlin S., et al. Non-selective cation channel activity of aquaporin AtPIP2; 1 regulated by Ca^{2+} and pH. *Plant, cell & environment*, 2017, vol. 40, no 6, p. 802-815.

CÁRDENAS-NAVARRO, Raúl; ADAMOWICZ, Stéphane; ROBIN, Paul. Nitrate accumulation in plants: a role for water. *Journal of Experimental Botany*, 1999, vol. 50, no 334, p. 613-624.

CAUSTON, Helen C., et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 2001, vol. 12, no 2, p. 323-337.

CHALKER-SCOTT, Linda. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and photobiology*, 1999, vol. 70, no 1, p. 1-9.

CHAN, Zhulong; LOESCHER, Wayne; GRUMET, Rebecca. Transcriptional variation in response to salt stress in commonly used *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant physiology and biochemistry*, 2013, vol. 73, p. 189-201.

CHEESEMAN, John M. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant physiology*, 1988, vol. 87, no 3, p. 547-550.

CHEESEMAN, John M. The integration of activity in saline environments: problems and perspectives. *Functional Plant Biology*, 2013, vol. 40, no 9, p. 759-774.

CHEN, Chun-Zhu, et al. *Arabidopsis* NRT1. 5 is another essential component in regulation of nitrate reallocation and stress tolerance. *Plant Physiology*, 2012, p. pp. 112.199257.

CLARKSON, D. T.; SAKER, L. R.; PURVES, J. V. Transport in barley plants with diminished sulphate status. Evidence of co-regulation of nitrogen and sulphate intake. *Journal of Experimental Botany (UK)*, 1989.

CRAWFORD, Nigel M.; GLASS, Anthony DM. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in plant science*, 1998, vol. 3, no 10, p. 389-395.

CUIN, Tracey Ann, et al. Ionic relations and osmotic adjustment in durum and bread wheat under saline conditions. *Functional Plant Biology*, 2009, vol. 36, no 12, p. 1110-1119.

DAVENPORT, Romola Jane, et al. The Na^+ transporter AtHKT1; 1 controls retrieval of Na^+ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment*, 2007, vol. 30, no 4, p. 497-507.

DAVENPORT, Romola Jane; TESTER, Mark. A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant physiology*, 2000, vol. 122, no 3, p. 823-834.

- DE LUCA, Anna; PARDO, José M.; LEIDI, Eduardo O. Pleiotropic effects of enhancing vacuolar K/H exchange in tomato. *Physiologia plantarum*, 2018, vol. 163, no 1, p. 88-102.
- DEMIDCHIK, Vadim. Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells. *Journal of Plant Physiology*, 2014, vol. 171, no 9, p. 696-707.
- DEMIDCHIK, Vadim; DAVENPORT, Romola Jane; TESTER, Mark. Nonselective cation channels in plants. *Annual review of plant biology*, 2002, vol. 53, no 1, p. 67-107.
- DEMIDCHIK, Vadim; MAATHUIS, Frans JM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*, 2007, vol. 175, no 3, p. 387-404.
- DÍAZ-LÓPEZ, Leyanes, et al. The tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: An ecophysiological analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, vol. 54, p. 34-42.
- DODDEMA, H. E. N. K.; HOFSTRA, J. J.; FEENSTRA, W. J. Uptake of Nitrate by Mutants of *Arabidopsis thaliana*, Disturbed in Uptake or Reduction of Nitrate: I. Effect of Nitrogen Source during Growth on Uptake of Nitrate and Chlorate. *Physiologia plantarum*, 1978, vol. 43, no 4, p. 343-350.
- DOLFERUS, Rudy. To grow or not to grow: a stressful decision for plants. *Plant Science*, 2014, vol. 229, p. 247-261.
- DRECHSLER, Navina, et al. Nitrate-dependent control of shoot K homeostasis by NPF7.3/NRT1.5 and SKOR in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 2015, p. pp. 01152.2015.
- ESSAH, Pauline A.; DAVENPORT, Romola; TESTER, Mark. Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2003, vol. 133, no 1, p. 307-318.
- EVANS, Harold J.; SORGER, George J. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annual review of plant physiology*, 1966, vol. 17, no 1, p. 47-76.
- FARQUHARSON, Kathleen L. Targeted overexpression of a sodium transporter in the root stele increases salinity tolerance. 2009.
- FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental botany*, 2004, vol. 55, no 396, p. 307-319.
- FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual review of plant physiology*, 1977, vol. 28, no 1, p. 89-121.
- FLOWERS, Timothy J.; GALAL, Hanaa K.; BROMHAM, Lindell. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, 2010, vol. 37, no 7, p. 604-612.
- FLOWERS, Timothy J.; MUNNS, Rana; COLMER, Timothy D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of botany*, 2014, vol. 115, no 3, p. 419-431.

- FLOWERS, Timothy J.; COLMER, Timothy D. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 2008, vol. 179, no 4, p. 945-963.
- FRAILE-ESCANCIANO, Ana, et al. The SOS1 transporter of *Physcomitrella patens* mediates sodium efflux in planta. *New Phytologist*, 2010, vol. 188, no 3, p. 750-761.
- FRANCO-NAVARRO, Juan D., et al. Chloride regulates leaf cell size and water relations in tobacco plants. *Journal of experimental botany*, 2015, vol. 67, no 3, p. 873-891.
- FRENSCH, Jurgen; HSIAO, Theodore C. Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. *Plant Physiology*, 1994, vol. 104, no 1, p. 247-254.
- FRICKE, Wieland; LEIGH, Roger A.; TOMOS, A. Deri. The intercellular distribution of vacuolar solutes in the epidermis and mesophyll of barley leaves changes in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*, 1996, vol. 47, no 9, p. 1413-1426.
- FURUMOTO, Tsuyoshi, et al. A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature*, 2011, vol. 476, no 7361, p. 472.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, María J., et al. Sodium-Dependent Nitrate Transport at the Plasma Membrane of Leaf Cells of the Marine Higher Plant *Zostera marina* L. *Plant physiology*, 2000, vol. 122, no 3, p. 879-886.
- GARCIA, A., et al. Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium: potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 1997, vol. 20, no 9, p. 1167-1174.
- GARCIADABLÁS, Blanca, et al. Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *The Plant Journal*, 2003, vol. 34, no 6, p. 788-801.
- GARCIADABLÁS, Blanca; HARO, Rosario; BENITO, Begona. Cloning of two SOS1 transporters from the seagrass *Cymodocea nodosa*. SOS1 transporters from *Cymodocea* and *Arabidopsis* mediate potassium uptake in bacteria. *Plant Molecular Biology*, 2007, vol. 63, no 4, p. 479-490.
- GAYMARD, Frédéric, et al. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*, 1998, vol. 94, no 5, p. 647-655.
- GENC, Yusuf, et al. Uncoupling of sodium and chloride to assist breeding for salinity tolerance in crops. *New Phytologist*, 2016, vol. 210, no 1, p. 145-156.
- GIERTH, Markus; MÄSER, Pascal. Potassium transporters in plants—involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS letters*, 2007, vol. 581, no 12, p. 2348-2356.
- GLASS, Anthony DM; KOTUR, Zorica. A reevaluation of the role of *Arabidopsis* NRT1.1 in high-affinity nitrate transport. *Plant physiology*, 2013, vol. 163, no 3, p. 1103-1106.

GUZMAN, Luz-Maria, et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology*, 1995, vol. 177, no 14, p. 4121-4130.

HALFTER, Ursula; ISHITANI, Manabu; ZHU, Jian-Kang. The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, vol. 97, no 7, p. 3735-3740.

HANDA, Sangita, et al. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiology*, 1983, vol. 73, no 3, p. 834-843.

HARO, Rosario; BAÑUELOS, María A.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, Alonso. High-affinity sodium uptake in land plants. *Plant and cell physiology*, 2009, vol. 51, no 1, p. 68-79.

HASEGAWA, Paul M. Sodium (Na^+) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany*, 2013, vol. 92, p. 19-31.

HASEGAWA, Paul M., et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 2000, vol. 51, no 1, p. 463-499.

HAUSER, Felix; HORIE, Tomoaki. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K^+/Na^+ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, cell & environment*, 2010, vol. 33, no 4, p. 552-565.

HECKMAN, Daniel S., et al. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*, 2001, vol. 293, no 5532, p. 1129-1133.

PARDO, José M. Mutants of the Arabidopsis thaliana Cation/H Antiporter AtNHX1 Conferring Increased Salt Tolerance in Yeast. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2009, vol. 284, no 21, p. 14276-14285.

HEYSER, James W.; NABORS, Murray W. Growth, water content, and solute accumulation of two tobacco cell lines cultured on sodium chloride, dextran, and polyethylene glycol. *Plant physiology*, 1981, vol. 68, no 6, p. 1454-1459.

HEYSER, James W.; NABORS, Murray W. Osmotic adjustment of cultured tobacco cells (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) grown on sodium chloride. *Plant physiology*, 1981, vol. 67, no 4, p. 720-727.

HO, Cheng-Hsun, et al. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 2009, vol. 138, no 6, p. 1184-1194.

HORIE, Tomoaki; HAUSER, Felix; SCHROEDER, Julian I. HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in plant science*, 2009, vol. 14, no 12, p. 660-668.

- HORIE, Tomoaki, et al. Functions of HKT transporters in sodium transport in roots and in protecting leaves from salinity stress. *Plant Biotechnology*, 2008, vol. 25, no 3, p. 233-239.
- HSIAO, Th C., et al. Water stress, growth and osmotic adjustment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1976, vol. 273, no 927, p. 479-500.
- HUANCA-MAMANI, Wilson, et al. Long Non-Coding RNAs Responsive to Salt and Boron Stress in the Hyper-Arid Lluteño Maize from Atacama Desert. *Genes*, 2018, vol. 9, no 3, p. 170.
- HUANG, Nien-Chen, et al. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant Cell*, 1999, vol. 11, no 8, p. 1381-1392.
- INSKEEP, William P.; BLOOM, Paul R. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant physiology*, 1985, vol. 77, no 2, p. 483-485.
- ISHITANI, Manabu, et al. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *The Plant Cell*, 2000, vol. 12, no 9, p. 1667-1677.
- JACOBS, Andrew, et al. Rice plants expressing the moss sodium pumping ATPase PpENA1 maintain greater biomass production under salt stress. *Plant biotechnology journal*, 2011, vol. 9, no 8, p. 838-847.
- JARVIS, David E., et al. Distinct roles for SOS1 in the convergent evolution of salt tolerance in *Eutrema salsugineum* and *Schrenkiella parvula*. *Molecular biology and evolution*, 2014, vol. 31, no 8, p. 2094-2107.
- JHA, D., et al. Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in Arabidopsis ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. *Plant, Cell & Environment*, 2010, vol. 33, no 5, p. 793-804.
- Jl, Hongtao, et al. The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Molecular plant*, 2013, vol. 6, no 2, p. 275-286.
- JIANG, Yuanqing; DEYHOLOS, Michael K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed Arabidopsis roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biology*, 2006, vol. 6, no 1, p. 25.
- KABURAGI, Emi, et al. Sodium enhances nitrate uptake in Swiss chard (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.). *Soil science and plant nutrition*, 2014, vol. 60, no 5, p. 651-658.
- KABURAGI, Emi; YAMADA, Mina; FUJIYAMA, Hideyasu. Sodium, but not potassium, enhances root to leaf nitrate translocation in Swiss chard (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 2015, vol. 112, p. 27-32.

- KADDOUR, Rym, et al. Physiological and molecular characterization of salt response of *Arabidopsis thaliana* NOK2 ecotype. *Acta physiologiae plantarum*, 2010, vol. 32, no 3, p. 503-510.
- KAPLAN, A., et al. An essential role for sodium in the bicarbonate transporting system of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEBS letters*, 1984, vol. 176, no 1, p. 166-168.
- KATORI, Taku, et al. Dissecting the genetic control of natural variation in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of Experimental Botany*, 2010, vol. 61, no 4, p. 1125-1138.
- KATSCHNIG, Diana, et al. Constitutive high-level SOS1 expression and absence of HKT1; 1 expression in the salt-accumulating halophyte *Salicornia dolichostachya*. *Plant Science*, 2015, vol. 234, p. 144-154.
- KILIAN, Joachim, et al. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal*, 2007, vol. 50, no 2, p. 347-363.
- KIM, Daehwan; LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*, 2015, vol. 12, no 4, p. 357.
- KIM, Woe-Yeon, et al. Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in *Arabidopsis*. *Nature communications*, 2013, vol. 4, p. 1352.
- KINRAIDE, Thomas B. Interactions among Ca^{2+} , Na^{+} and K^{+} in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects. *Journal of Experimental Botany*, 1999, vol. 50, no 338, p. 1495-1505.
- KONG, Xiangqiang, et al. Overexpression of ENA1 from yeast increases salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 2008, vol. 51, no 2, p. 159-165.
- KRAPP, Anne, et al. Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 2014, vol. 65, no 3, p. 789-798.
- KREPS, Joel A., et al. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant physiology*, 2002, vol. 130, no 4, p. 2129-2141.
- KRONZUCKER, Herbert J.; BRITTO, Dev T. Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytologist*, 2011, vol. 189, no 1, p. 54-81.
- BRITTO, T. Herbert J. Kronzucker, Devrim Coskun, Lasse M. Schulze, Jessie R. Wong & Dev. *Plant Soil*, 2013, vol. 369, p. 1-23.
- KROUK, Gabriel, et al. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1. 1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental cell*, 2010, vol. 18, no 6, p. 927-937.

- LABIDI, Nehla, et al. Variability of the response to sodium chloride of eight ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant nutrition*, 2002, vol. 25, no 12, p. 2627-2638.
- LANGMEAD, Ben, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 2009, vol. 10, no 3, p. R25.
- LAUTER, David J.; MEIRI, Avraham; SHUALI, Margot. Isoosmotic regulation of cotton and peanut at saline concentrations of K and Na. *Plant physiology*, 1988, vol. 87, no 4, p. 911-916.
- LEIDI, Eduardo O., et al. The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*, 2010, vol. 61, no 3, p. 495-506.
- LI, Bo, et al. Identification of a stelar-localised transport protein that facilitates root-to-shoot transfer of chloride in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2015, p. pp. 01163.2015.
- LI, Bo; DEWEY, Colin N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 2011, vol. 12, no 1, p. 323.
- LI, Bo, et al. AtNPF2. 5 modulates chloride (Cl⁻) efflux from roots of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 2017, vol. 7, p. 2013.
- LI, Bo; TESTER, Mark; GILLIHAM, Matthew. Chloride on the move. *Trends in plant science*, 2017, vol. 22, no 3, p. 236-248.
- LI, Hong, et al. NRT1. 5/NPF7. 3 functions as a proton-coupled H⁺/K⁺ antiporter for K⁺ loading into the xylem in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2017, p. tpc. 00972.2016.
- LI, Jian-Yong, et al. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1. 8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *The Plant Cell*, 2010, p. tpc. 110.075242.
- LIU, Jiping, et al. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2000, vol. 97, no 7, p. 3730-3734.
- LIU, Tzu-Yin; CHANG, Chiung-Yun; CHIOU, Tzyy-Jen. The long-distance signaling of mineral macronutrients. *Current opinion in plant biology*, 2009, vol. 12, no 3, p. 312-319.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *methods*, 2001, vol. 25, no 4, p. 402-408.
- LOUDET, Olivier, et al. Quantitative trait loci analysis of water and anion contents in interaction with nitrogen availability in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2003, vol. 163, no 2, p. 711-722.
- MA, Shisong; GONG, Qingqiu; BOHNERT, Hans J. Dissecting salt stress pathways. *Journal of experimental botany*, 2006, vol. 57, no 5, p. 1097-1107.

- MAATHUIS, Frans JM; AMTMANN, Anna. K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular K^+/Na^+ ratios. *Annals of Botany*, 1999, vol. 84, no 2, p. 123-133.
- MAATHUIS, Frans JM; SANDERS, Dale. Sodium uptake in Arabidopsis roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiology*, 2001, vol. 127, no 4, p. 1617-1625.
- MAATHUIS, Frans JM. Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany*, 2013, vol. 65, no 3, p. 849-858.
- MAATHUIS, Frans JM, et al. Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *The Plant Journal*, 2003, vol. 35, no 6, p. 675-692.
- MAGGIO, Albino, et al. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction?. *The plant journal*, 2002, vol. 31, no 6, p. 699-712.
- MAGGIO, Albino, et al. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, vol. 59, no 3, p. 276-282.
- MAHAJAN, Shilpi; PANDEY, Girdhar K.; TUTEJA, Narendra. Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2008, vol. 471, no 2, p. 146-158.
- MAIERHOFER, Tobias, et al. A single-pore residue renders the Arabidopsis root anion channel SLAH2 highly nitrate selective. *The Plant Cell*, 2014, p. tpc. 114.125849.
- MCINTYRE, G. I. The role of nitrate in the osmotic and nutritional control of plant development. *Functional Plant Biology*, 1997, vol. 24, no 2, p. 103-118.
- MI, Huaiyu, et al. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic acids research*, 2016, vol. 45, no D1, p. D183-D189.
- MØLLER, Inge S., et al. Shoot Na^+ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na^+ transport in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2009, vol. 21, no 7, p. 2163-2178.
- MØLLER, Inge Skrumsager; TESTER, Mark. Salinity tolerance of Arabidopsis: a good model for cereals?. *Trends in plant science*, 2007, vol. 12, no 12, p. 534-540.
- MORGAN, James M. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual review of plant physiology*, 1984, vol. 35, no 1, p. 299-319.
- MUNNS, Rana. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 2002, vol. 25, no 2, p. 239-250.
- MUNNS, Rana. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 2005, vol. 167, no 3, p. 645-663.

MUNNS, Rana, et al. Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Functional Plant Biology*, 2016, vol. 43, no 12, p. 1103-1113.

MUNNS, Rana, et al. New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *Journal of experimental botany*, 2010, vol. 61, no 13, p. 3499-3507.

MUNNS, Rana; TESTER, Mark. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, vol. 59, p. 651-681.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 1962, vol. 15, no 3, p. 473-497.

NACRY, Philippe; BOUGUYON, Eléonore; GOJON, Alain. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil*, 2013, vol. 370, no 1-2, p. 1-29.

NIE, Lingling, et al. Comparative proteomics of root plasma membrane proteins reveals the involvement of calcium signalling in NaCl-facilitated nitrate uptake in *Salicornia europaea*. *Journal of experimental botany*, 2015, vol. 66, no 15, p. 4497-4510.

NIEVES-CORDONES, Manuel, et al. The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Molecular plant*, 2010, vol. 3, no 2, p. 326-333.

O'BRIEN, José A., et al. Nitrate transport, sensing, and responses in plants. *Molecular Plant*, 2016, vol. 9, no 6, p. 837-856.

OH, Dong-Ha, et al. Loss of halophytism by interference with SOS1 expression. *Plant physiology*, 2009, vol. 151, no 1, p. 210-222.

OH, Dong-Ha, et al. Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 2010, vol. 61, no 4, p. 1205-1213.

OHNISHI, Jun-Ichi; KANAI, Ryuzi. Na⁺-induced uptake of pyruvate into mesophyll chloroplasts of a C4 plant, *Panicum miliaceum*. *FEBS letters*, 1987, vol. 219, no 2, p. 347-350.

OKAMOTO, Mamoru; VIDMAR, J. John; GLASS, Anthony DM. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant and cell Physiology*, 2003, vol. 44, no 3, p. 304-317.

ONDZIGHI-ASSOUME, Christine Andeme; CHAKRABORTY, Sanhita; HARRIS, Jeanne M. Environmental nitrate stimulates root tip abscisic acid accumulation via release from inactive stores. *The Plant Cell*, 2016, p. TPC2015-00946-RA.

PARDO, Jose M.; QUINTERO, Francisco J. Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. *Genome Biology*, 2002, vol. 3, no 6, p. reviews1017. 1.

PARDO, José M., et al. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of experimental botany*, 2006, vol. 57, no 5, p. 1181-1199.

PARKER, Joanne L.; NEWSTEAD, Simon. Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1. 1. *Nature*, 2014, vol. 507, no 7490, p. 68.

PLAUT, Zvi; FEDERMAN, Evelyn. A simple procedure to overcome polyethylene glycol toxicity on whole plants. *Plant physiology*, 1985, vol. 79, no 2, p. 559-561.

PLETT, Darren, et al. Improved salinity tolerance of rice through cell type-specific expression of AtHKT1; 1. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no 9, p. e12571.

QIU, Quan-Sheng, et al. Na^+/H^+ exchange activity in the plasma membrane of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2003, vol. 132, no 2, p. 1041-1052.

QIU, Quan-Sheng, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no 12, p. 8436-8441.

QIU, Quan-Sheng, et al. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in Arabidopsis thaliana by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no 1, p. 207-215.

QUESADA, Victor, et al. Genetic architecture of NaCl tolerance in Arabidopsis. *Plant physiology*, 2002, vol. 130, no 2, p. 951-963.

QUINTERO, Francisco J., et al. Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na^+ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no 13, p. 9061-9066.

RAHNAMA, Afrasyab, et al. Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. *Functional Plant Biology*, 2010, vol. 37, no 3, p. 255-263.

RAJENDRAN, Karthika; TESTER, Mark; ROY, Stuart J. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, cell & environment*, 2009, vol. 32, no 3, p. 237-249.

REES, T. Alwyn V.; CRESSWELL, Raymond C.; SYRETT, Philip J. Sodium-dependent uptake of nitrate and urea by a marine diatom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1980, vol. 596, no 1, p. 141-144.

REN, Zhonghai, et al. RAS1, a quantitative trait locus for salt tolerance and ABA sensitivity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, p. 200910798.

ROBINSON, Simon P.; DOWNTON, W. John S.; MILLHOUSE, Jenny A. Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach. *Plant Physiology*, 1983, vol. 73, no 2, p. 238-242.

- RÓDENAS, Reyes, et al. NO₃⁻, PO₄³⁻ and SO₄²⁻ deprivation reduced LKT1-mediated low-affinity K⁺ uptake and SKOR-mediated K⁺ translocation in tomato and Arabidopsis plants. *Physiologia plantarum*, 2017, vol. 160, no 4, p. 410-424.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, Alonso; RAMOS, José. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 1984, vol. 159, no 3, p. 940-945.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, Alonso; RUBIO, Francisco. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2006, vol. 57, no 5, p. 1149-1160.
- RONCHI, Angela, et al. Effects of a triazolic fungicide on maize plant metabolism: modifications of transcript abundance in resistance-related pathways. *Plant Science*, 1997, vol. 130, no 1, p. 51-62.
- ROOMANS, G. M.; BLASCO, F.; BORST-PAUWELS, G. W. F. H. Cotransport of phosphate and sodium by yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1977, vol. 467, no 1, p. 65-71.
- ROY, Stuart J.; NEGRÃO, Sónia; TESTER, Mark. Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, vol. 26, p. 115-124.
- ROZEMA, Jelte; SCHAT, Henk. Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, 2013, vol. 92, p. 83-95.
- RUBIO, Francisco, et al. Studies on Arabidopsis athak5, atakt1 double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K⁺ uptake. *Physiologia plantarum*, 2010, vol. 139, no 2, p. 220-228.
- RUBIO, Francisco, et al. Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia plantarum*, 2008, vol. 134, no 4, p. 598-608.
- RUS, Ana, et al. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2001, vol. 98, no 24, p. 14150-14155.
- RUS, Ana, et al. Natural variants of AtHKT1 enhance Na⁺ accumulation in two wild populations of Arabidopsis. *PLoS genetics*, 2006, vol. 2, no 12, p. e210.
- Rus, Ana, Byeong-ha Lee, Alicia Muñoz-Mayor, Altanbadralt Sharkhuu, Kenji Miura, Jian-Kang Zhu, Ray a Bressan, et al. 2004. "AtHKT1 Facilitates Na⁺ Homeostasis and K⁺ Nutrition." *Plant Physiology* 136 (September 2004): 2500–2511. doi:10.1104/pp.104.042234.2500.
- RUS, Ana, et al. AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant physiology*, 2004, vol. 136, no 1, p. 2500-2511.

- SALIM, M. Effects of salinity and relative humidity on growth and ionic relations of plants. *New Phytologist*, 1989, vol. 113, no 1, p. 13-20.
- SCHACHTMAN, Daniel; LIU, Weihong. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends in plant science*, 1999, vol. 4, no 7, p. 281-287.
- SCHACHTMAN, Daniel P., et al. Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, vol. 94, no 20, p. 11079-11084.
- SCHLEYER, Manfred; SCHMID, Roland; BAKKER, Evert P. Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock. *Archives of Microbiology*, 1993, vol. 160, no 6, p. 424-431.
- SCHULZE, Lasse M., et al. A pharmacological analysis of high-affinity sodium transport in barley (*Hordeum vulgare* L.): a $24\text{Na}^+/42\text{K}^+$ study. *Journal of experimental botany*, 2012, vol. 63, no 7, p. 2479-2489.
- SHABALA, Sergey N.; LEW, Roger R. Turgor regulation in osmotically stressed *Arabidopsis* epidermal root cells. Direct support for the role of inorganic ion uptake as revealed by concurrent flux and cell turgor measurements. *Plant physiology*, 2002, vol. 129, no 1, p. 290-299.
- SHABALA, Sergey. Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of botany*, 2013, vol. 112, no 7, p. 1209-1221.
- SHABALA, Sergey; CUIN, Tracey A. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 2008, vol. 133, no 4, p. 651-669.
- SHABALA, Sergey, et al. Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl -induced K^+ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K^+ -permeable channels. *Plant physiology*, 2006, vol. 141, no 4, p. 1653-1665.
- SHALHEVET, J.; HSIAO, Th C. Salinity and drought. *Irrigation Science*, 1986, vol. 7, no 4, p. 249-264.
- SHI, Huazhong, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2000, vol. 97, no 12, p. 6896-6901.
- SHI, Huazhong, et al. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature biotechnology*, 2003, vol. 21, no 1, p. 81.
- SHI, Huazhong, et al. The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter *SOS1* controls long-distance Na^+ transport in plants. *The Plant Cell*, 2002, vol. 14, no 2, p. 465-477.

- SHIN, Ryoung; BERG, R. Howard; SCHACHTMAN, Daniel P. Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant and Cell Physiology*, 2005, vol. 46, no 8, p. 1350-1357.
- SHINDO, Chikako, et al. Role of FRIGIDA and FLOWERING LOCUS C in determining variation in flowering time of Arabidopsis. *Plant physiology*, 2005, vol. 138, no 2, p. 1163-1173.
- SIEGENTHALER, Paul André; BELSKY, Melvin M.; GOLDSTEIN, Solomon. Phosphate uptake in an obligately marine fungus: a specific requirement for sodium. *Science*, 1967, vol. 155, no 3758, p. 93-94.
- JARVIS, P. G.; JARVIS, Margaret S. Effects of several osmotic substrates on the growth of *Lupinus albus* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 1963, vol. 16, no 3, p. 485-500.
- SMITH, T. E., et al. pH dependent salinity-boron interactions impact yield, biomass, evapotranspiration and boron uptake in broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Plant and soil*, 2013, vol. 370, no 1-2, p. 541-554.
- BERNSTEIN, Leon. Osmotic adjustment of plants to saline media. II. Dynamic phase. *American Journal of Botany*, 1963, vol. 50, no 4, p. 360-370.
- SONG, Chun-Peng, et al. A probable Na^+ (K^+)/ H^+ exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, vol. 101, no 27, p. 10211-10216.
- SPARKS, Erin; WACHSMAN, Guy; BENFEY, Philip N. Spatiotemporal signalling in plant development. *Nature Reviews Genetics*, 2013, vol. 14, no 9, p. 631.
- STEINBACH, H. Burr. The prevalence of K. *Perspectives in biology and medicine*, 1962, vol. 5, no 3, p. 338-355.
- SUBBARAO, G. V., et al. Sodium—a functional plant nutrient. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2003, vol. 22, no 5, p. 391-416.
- SUNARPI, HORIE, Tomoaki, et al. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na^+ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *The Plant Journal*, 2005, vol. 44, no 6, p. 928-938.
- TAJI, Teruaki, et al. Comparative genomic analysis of 1047 completely sequenced cDNAs from an Arabidopsis-related model halophyte, *Thellungiella halophila*. *BMC plant biology*, 2010, vol. 10, no 1, p. 261.
- TAKANO, Junpei, et al. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature*, 2002, vol. 420, no 6913, p. 337.
- TAOCHY, Christelle, et al. The Arabidopsis root stele transporter NPF2.3 contributes to nitrate translocation to shoots under salt stress. *The Plant Journal*, 2015, vol. 83, no 3, p. 466-479.

TARAZONA, Sonia, et al. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome research*, 2011, p. gr. 124321.111.

TAZUKE, Akio; KINOSHITA, Tsuguki. The effects of NaCl salinity and solution temperature on the leaf wilting of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plantlets grown hydroponically. *Environmental Control in Biology*, 2014, vol. 51, no 4, p. 201-206.

TEAKLE, Natasha L.; TYERMAN, Stephen D. Mechanisms of Cl-transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 2010, vol. 33, no 4, p. 566-589.

TESTER, Mark; DAVENPORT, Romola. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of botany*, 2003, vol. 91, no 5, p. 503-527.

TOURAINÉ, Bruno; GLASS, Anthony DM. NO₃-and ClO₃-Fluxes in the chl1-5 Mutant of *Arabidopsis thaliana* (Does the CHL1-5 Gene Encode a Low-Affinity NO₃-Transporter?). *Plant Physiology*, 1997, vol. 114, no 1, p. 137-144.

TSAY, Yi-Fang, et al. The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, 1993, vol. 72, no 5, p. 705-713.

TYERMAN, Stephen D., et al. Pathways for the permeation of Na⁺ and Cl-into protoplasts derived from the cortex of wheat roots. *Journal of Experimental Botany*, 1997, p. 459-480.

UOZUMI, Nobuyuki, et al. The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*, 2000, vol. 122, no 4, p. 1249-1260.

VENEMA, Kees, et al. The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no 4, p. 2413-2418.

VIDMAR, Joseph John, et al. Regulation of the hvst1 gene encoding a high-affinity sulfate transporter from *Hordeum vulgare*. *Plant Molecular Biology*, 1999, vol. 40, no 5, p. 883-892.

VOLKOV, V., et al. *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant, Cell & Environment*, 2004, vol. 27, no 1, p. 1-14.

VOLKOV, V., et al. *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant, Cell & Environment*, 2004, vol. 27, no 1, p. 1-14.

VON WITTGENSTEIN, Neil JJB, et al. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC evolutionary biology*, 2014, vol. 14, no 1, p. 11.

WANG, Rongchen, et al. Genomic analysis of a nutrient response in Arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *The Plant Cell*, 2000, vol. 12, no 8, p. 1491-1509.

WANG, Rongchen, et al. Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant physiology*, 2003, vol. 132, no 2, p. 556-567.

Wang, Y H, D F Garvin, and L V Kochian. 2001. "Nitrate-Induced Genes in Tomato Roots. Array Analysis Reveals Novel Genes That May Play a Role in Nitrogen Nutrition." *Plant Physiology* 127 (1): 345–59. doi:10.1104/PP.127.1.345.

WANG, Yi-Hong; GARVIN, David F.; KOCHIAN, Leon V. Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, 2001, vol. 127, no 1, p. 345-359.

WANG, Ya-Yun; HSU, Po-Kai; TSAY, Yi-Fang. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in plant science*, 2012, vol. 17, no 8, p. 458-467.

WEGNER, Lars H.; DE BOER, Albertus H. Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K⁺ homeostasis and long-distance signaling. *Plant Physiology*, 1997, vol. 115, no 4, p. 1707-1719.

WIMMER, Monika A.; GOLDBACH, Heiner E. Boron-and-salt interactions in wheat are affected by boron supply. *Journal of plant nutrition and soil science*, 2012, vol. 175, no 2, p. 171-179.

WU, Shaw-Jye; DING, Lei; ZHU, Jian-Kang. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *The Plant Cell*, 1996, vol. 8, no 4, p. 617-627.

XIONG, Liming; SCHUMAKER, Karen S.; ZHU, Jian-Kang. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The plant cell*, 2002, vol. 14, no suppl 1, p. S165-S183.

YADAV, Rattan; FLOWERS, T. J.; YEO, A. R. The involvement of the transpirational bypass flow in sodium uptake by high-and low-sodium-transporting lines of rice developed through intravarietal selection. *Plant, Cell & Environment*, 1996, vol. 19, no 3, p. 329-336.

YANG, Wenzhu, et al. Transcriptome analysis of nitrogen-starvation-responsive genes in rice. *BMC plant biology*, 2015, vol. 15, no 1, p. 31.

YEO, A. R.; FLOWERS, T. J. The absence of an effect of the na/ca ratio on sodium chloride uptake by rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist*, 1985, vol. 99, no 1, p. 81-90.

YEO, A. R.; YEO, M. E.; FLOWERS, T. J. The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *Journal of Experimental Botany*, 1987, vol. 38, no 7, p. 1141-1153.

YEO, A. R.; FLOWERS, T. J. Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. *Physiologia Plantarum*, 1983, vol. 59, no 2, p. 189-195.

JUNFENG, Yuan.; CHANGYAN, Tian.; GU, Feng. Effects of sodium on nitrate uptake and osmotic adjustment of Suaeda physophora. *Journal of Arid Land*, 2010, vol. 2, no 3, p. 190-196.

YUE, Yuesen, et al. SOS1 gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K^+/Na^+ ratio. *Journal of Plant Physiology*, 2012, vol. 169, no 3, p. 255-261.

ZHU, Jian-Kang. Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. *Plant physiology*, 2000, vol. 124, no 3, p. 941-948.

ZHU, Jian-Kang. Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 2001, vol. 6, no 2, p. 66-71.

ZHU, Jian-Kang. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinion in plant biology*, 2003, vol. 6, no 5, p. 441-445.