



# Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

# CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN TRANSPORTADOR DE POTASIO DE ALTA AFINIDAD DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

Tesis que presenta

NANCY RUIZ LAU

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2012



CIENCIAN CONTRACTOR

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Poegrado en Ciencias Biológinas PLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL OF UN TRAMSPORTADOR DE POTASIO DE ALTA AFINIDAD DE CHILE HABANERO (Gepsicum chimense Jacq.) Tesis que presenta NANCY RUIZ LAU En opción al título de DOCTOR EN CIENCIAS

Jiencies Biológicas: Opción Bioquimica y Biología Motecutaria

Mérida, Yucatàn, Niéxico

2012

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS





#### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de Tesis titulado CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN TRANSPORTADOR DE POTASIO DE ALTA AFINIDAD DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense Jacq.*) fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez y la Dra. Begoña Benito Casado, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

**Director Académico** 

Mérida, Yucatán, México, a 10 de agosto de 2012.

SUTTO DE INVESTIGACIÓN DE VITRICA DE VICATAN A. C

OSBRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



All moto de la presidier de lango constanços el trabajo de Tesia títulido CLCHACIÓN V CARACIERIZACIÓN PUNCIÓNAL DE UN TRANSPORTADOR DE POTABIO DE ALTA AFINIDAO DE CHILE HABANERO (Capatouri chinense Ling), fue resilizado un los ucontónica de la Unidad de Brouchrida y Ribiogía Morecular de Provise del Cellino de Inventosida de la Unidad de Brouchrida y Ribiogía Morecular de Provise del Cellino de Inventosida de la Unidad de Provisión A.C. tiqu la dirección del Or Manuel Mannet Electrica de la Contraca de Yunatim, A.C. tiqu la dirección del Or Manuel Mannet Residue de Cepiña Bernici Casado, dentro de la opotón de Stopulmice y Biología Multicular de Poesta Dentra Electrica de la opotón de Stopulmice y Biología Multicular de Cepiña Bernici Casado, dentro de la opotón de Stopulmice y Biología Multicular de Casado, dentro de la opotón de Stopulmice y Biología Multicular de Casado, dentro de la opotón de Stopulmice y Biología Multicular de Casado, dentro de la opotón de Stopulmice y Biología Multicular de Casado, dentro de la opotón de Stopulmice y Biología Multicular de Casado, dentro de la opotón de Stopulmice y Biología Multicular de Casado, dentro de la opotón de Stopulmice y Biología de la dirección de Stopulmice y Biología

Aler americ

V Oscer A, Noreno Valenzuela
Director Acadêmico

Ports Monoro a 10 de spole du 2012

#### DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: Nombre: M/C. Nancy Ruiz Lau

and the second second second second second second

construction and the second second

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán y en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid, y forma parte del proyecto titulado CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN TRANSPORTADOR DE POTASIO DE ALTA AFINIDAD DE CHILE HABANERO (*C. chinense* Jacq.) bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez y la Dra. Begoña Benito Casado.

#### AGRADECIMIENTOS

La presente tesis representa un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron muchas personas no solo leyendo y corrigiendo el documento; sino también, en el desarrollo del trabajo así como en mi formación académica a lo largo de estos cuatro años; por lo que agradezco:

Al CONACYT por la beca otorgada para los estudios de doctorado y por la beca mixta para la realización de un estancia de Investigación en el extranjero (No. de registro 205076).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y a la Unidad de Biología Molecular de Plantas del mismo centro, por el préstamo de sus instalaciones para la realización de la Tesis.

A la Dirección Académica presidida por el Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela por el otorgamiento de la Beca de Movilidad.

Al Dr. Manuel Martínez Estévez, por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección, por haber confiado en mí de nuevo y por formarme profesionalmente. También le agradezco por guiarme, por ser no solo mi jefe sino también un amigo desde mis inicios en el camino de la ciencia.

Al Dr. Alonso Rodríguez Navarro del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas-Universidad Politécnica de Madrid (CBGP-UPM), por aceptarme en su laboratorio y permitirme realizar parte de mi trabajo de Tesis mediante una estancia de Investigación.

A la Dra. Begoña Benito Casado del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas-Universidad Politécnica de Madrid (CBGP-UPM), por ser mi coasesora de tesis, por su orientación, por brindarme parte de su tiempo, por su amistad y por compartir conmigo todos sus conocimientos para enriquecer esta Tesis.

A mi comité tutorial integrado por: la Dra. Ileana Echevarría Machado del Centro de Investigación Científica de Yucatán (UBBMP), a la Dra. Ana Luisa Ramos Díaz del Centro de investigaciones y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco-CIATEJ- Unidad Sureste y al Dr. Igor Pottossin de la Universidad de Colima (CUIB); gracias por las observaciones y consejos que me brindaron en cada tutorial con el propósito de mejorar e enriquecer el trabajo de Tesis.

Al comité de revisión integrado por: la Dra. Begoña Benito Casado de la Universidad Politécnica de Madrid (CBGP), la Dra. Ana Luisa Ramos Díaz del Centro de investigaciones y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco-CIATEJ-Unidad Sureste, el Dr. Igor Pottossin de la Universidad de Colima (CUIB), a la Dra. Ileana Echevarría Machado, el Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, el Dr. Enrique Castaño de la Serna y el Dr. Manuel Martínez Estévez del Centro de Investigación Científica de Yucatán (UBBMP) por destinar parte de su tiempo a la lectura y corrección del documento con el propósito de mejorarlo.

A la Dra. Blanca García de Blas del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas-Universidad Politécnica de Madrid (CBGP-UPM), por todo su apoyo en el laboratorio, por sus consejos y tips para mejorar mi trabajo de Tesis y sobre todo por brindarme su amistad.

A la MC. Fátima Medina Lara por toda la ayuda técnica, por sus aportaciones y consejos para la realización de éste trabajo y sobre todo por brindarme su confianza y amistad durante todo este tiempo.

A la MC. Lucila Aurelia Sánchez Cach, por toda la ayuda técnica y consejos durante mis inicios en la Biología Molecular.

A la Dra. Rosario Haro del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas-Universidad Politécnica de Madrid (CBGP-UPM), por proporcionarnos el transportador HAK1 de *Neurospora crassa* (NcHAK1) y al Dr. Francisco Rubio del Departamento de Nutrición Vegetal, Centro de Edafología y Eiología Aplicada del SEGURA-CSIC; Murcia, España, por el transportador HAK1 de *Capsicum annuum* (CaHAK1).

Al grupo de trabajo del Dr. Aloreso Rodríguez Navarro (laboratorio 277, CBGP-UPM) integrado por: Dra. Begoña IBenito Casado, Dra. Blanca García de Blas, Dra. Rosario Haro, Dra. María Antonia Bañ uelos, Dra. Ana Claudia Ureta, Dra. Ana Frayle, FPII. Marcel Veldhuizen y Dr. Shady Abdel, por estar siempre en la mejor disposición para ayudarme

en todo lo que necesité durante mi estancia en su laboratorio y por hacerme sentir parte de su grupo.

Agradezco a todos mis amigos que me apoyaron durante mi estancia en Madrid: Ana Ojeda de la Calle y familia, por acogerme durante más de un año como uno más de sus integrantes; a Ana Isabel Bautista Rodríguez, Ana Frayle Escanciano, Ana Claudia Ureta, Rosabel Prieto y Ruth Castro Fernández, a todos ustedes gracias por los paseos, la compañía y amistad que me brindaron y que me hizo sentir como en casa.

A mis amigos y compañeros de grupo Fátima, Lucy, Naivy, Rocío, Goretty, Enid, Emanuel, Camilo y Luis Fernando, así como a los integrantes del laboratorio siete y 23. A todos ustedes gracias por hacer del laboratorio un buen lugar de trabajo, por su amistad y toda la ayuda brindada.

#### DEDICATORIAS

A quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme.

A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho.

A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo.

Por esto y más... Dedico este logro a mis padres, Luis M. Ruiz Ramírez y Nancy Lau Reay, quienes con su ejemplo de superación incansable me enseñaron día a día a luchar y a trabajar con esfuerzo para ser mejor. Quiero que sepan que mis logros son suyos también y que gracias a su apoyo y confianza lo hicieron posible.

A mis hermanos Luis, Carmela y Sergio, por su apoyo y paciencia durante todos estos años.

A mis sobrinas Mariana y Valentina, por iluminar siempre mis días.

Y Doy gracias a Dios por estar presente en mi vida, por darme la fuerza necesaria para seguir adelante, por iluminar mi camino para ser mejor cada día; y por cada uno de los logros y cosas maravillosas que abundan en mi vida.

"El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir".

Albert Einstein

# ÍNDICE

NTRODUCCIÓN		1
CAPÍTULO I		3
ANTECEDENTES		3
1.1 MODELO DE ESTUDIO: EL CH	ILE HABANERO (CAPSICUM CHINENSE JACQ.)	3
1.2 DISPONIBILIDAD DEL POTAS	SIO EN EL SUELO	3
1.3 EL POTASIO EN LOS SUELOS	DE YUCATÁN	5
1.4 EL POTASIO COMO ELEMENT	TO ESENCIAL	8
1.4.1 DISTRIBUCIÓN Y MOVILIDA	AD DEL POTASIO EN LAS PLANTAS	9
1.4.2 FUNCIONES BIOLÓGICAS	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	10
1.4.2.1 MUERTE CELULAR PROG	RAMADA	11
1.4.2.2 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS	Y ACTIVACIÓN DE ENZIMAS	12
1.4.2.3 BALANCE DE CARGAS		13
1.4.2.4 OTRAS FUNCIONES DEL P	POTASIO	15
1.5 MECANISMOS DE TRANSPOR	RTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS	17
1.6 TRANSPORTE DE IONES A TR	RAVÉS DE LA PLANTA	22
1.6.1 MECANISMOS INVOLUCRA PLANTAS	ADOS EN LA TOMA Y TRANSPORTE DE POTASIO	) EN
1.6.2 CANALES PERMEABLES A P	POTASIO	26
1.6.3 TRANSPORTADORES DE PO	OTASIO	30
1.6.3.1 TRANSPORTADORES KUP	P/HAK/KT	30

۰.

	1.6.3.2 TRANSPORTADORES TRK/HKT
	1.6.3.3 TRANSPORTADORES ANTIPORTE PROTÓN/CATIÓN (CPA)
	1.7 SISTEMA DE EXPRESION HETEROLOGA PARA EL ESTUDIO DE CANALES Y TRANSPORTADORES
	1.7.1 ESCHERICHIA COLI
	1.7.2 Ovocitos de Xenopus
	1.7.3 CÉLULAS DE INSECTO
	1.7.4 LEVADURAS
	1.7.4.1 SACCHAROMYCES CEREVISAE
	OBJETIVO GENERAL
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS
	JUSTIFICACIÓN
	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL
	BIBLIOGRAFÍA
c	APÍTULO II
	CLONACIÓN DE UN TRANSPORTADOR DE POTASIO TIPO HAK1 A PARTIR DE RAÍCES
	DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO (C. chinense Jacq.)63
	2.1 INTRODUCCIÓN
	2.2 MATERIALES Y MÉTODOS
	2.2.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL
	2.2.2 CULTIVO DE PLANTAS DE CHILE HABANERO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE POTASIO

2.2.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTERNO DE K <sup>+</sup> EN EL TEJIDO	5
2.3 EXTRACCIÓN DE ARN	5
2.4 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	ò
2.5 AMPLIFICACIÓN DE UN PRIMER FRAGMENTO INTERNO DE UN TRANSPORTADOR DE POTASIO TIPO HAK1	= 7
2.5.1 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RT-PCR	7
2.5.2 CLONACIÓN Y TRANFORMACIÓN	7
2.5.3 PURIFICACIÓN Y DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO (PCR2.1-TOPO + CCHAK1)	3
2.6 OBTENCIÓN DEL ADNC DE UN TRANSPORTADOR TIPO HA	3
2.6.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS	3
2.6.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' DE CCHAK1	)
2.6.3 OBTENCIÓN DEL ADNC DE CCHAK1	)
2.7 ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS	i
2.8 EXPRESIÓN SEMICUANTITATIVA DE CCHAK1	2
2.9 RESULTADOS	3
2.9.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTERNO DE POTASIO EN EL TEJIDO	\$
2.9.2 AMPLIFICACIÓN DE UN PRIMER FRAGMENTO Y OBTENCIÓN DEL ADNO DE UN TRANSPORTADOR TIPO HAK	3
2.9.3 COMPARACIÓN Y GENERACIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO DE CCHAK1 CON OTROS HAK'S DE OTRAS ESPECIES	1
2.9.4 DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA CCHAK1	?
2.9.4.1 PERFIL DE HIDROFOBICIDAD DE CCHAK1	2
	3

\*

	2.9.5 EXPRESIÓN DE CCHAK1	85
	2.10 DISCUSIÓN	. 86
	2.11 CONCLUSIONES	. 89
	BIBLIOGRAFÍA	. 90
C		. 93
	CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL TRANSPORTADOR CCHAK1	. 93
	3.1 INTRODUCCIÓN	. 93
	3.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	. 94
	3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	. 95
	3.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	. 95
	3.3.2 TRANSFORMACIÓN Y ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL EN GOTAS LEVADURA (S. cerevisiae)	EN . 97
	3.3.3 CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS TRANSFORMANTES DE LEVADURA	. 97
	3.3.4 ENSAYOS DE FLUJOS Y ACUMULACIÓN DE CATIONES EN LEVADURA	. 98
	3.4 RESULTADOS	. 99
	3.4.1 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CCHAK1 MEDIANTE ENSAYOS COMPLEMENTACIÓN EN MUTANTES DE LEVADURA.	DE . 99
	3.4.1.1 CCHAK1 CODIFICA A UN TRANSPORTADOR DE ALTA AFINIDAD	99
	3.4.1.2 CRECIMIENTO DE LOS TRANSFORMANTES DE LEVADURA CONCENTRACIONES MICROMOLARES DE POTASIO	EN 101
	3.4.1.3 ENSAYOS DE FLUJO Y ACUMULACIÓN DE CATIONES	104
	3.4.1.4 ESTUDIO DE INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE POTASIO MEDIADO P	OR

.

CcHAK1	17
3.4.1.5 CRECIMIENTO DE LOS TRANSFORMANTES DE LEVADURA EN PRESENCIA D	E
CLORURO DE SODIO	2
3.5 DISCUSIÓN	4
3.6 CONCLUSIONES	8
BIBLIOGRAFÍA	9
CAPÍTULO IV 12	!1
CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS	!1
BIBLIOGRAFÍA	25
ANEXO 1	9
1.1 INTRODUCCIÓN	9
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	0
1.2.1 MATERIAL VEGETAL 13	0
1.2.2 EXPERIMENTOS PARA EVALUAR LA ABSORCIÓN DE POTASIO	1
1.2.3 EFECTO DEL AMONIO SOBRE LA ABSORCIÓN DE POTASIO	1
1.2.4 ABSORCIÓN DE POTASIO EN PRESENCIA DE BLOQUEADORES DE CANALES 13	2

. .

# LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 El K <sup>+</sup> es introducido a través de canales (AKT) y transportadores (HAK)16	
Figura 1.2 Permeabilidad de la membrana plasmática	
Figura 1.3 Mecanismos de transporte a través de proteínas transportadoras	
Figura 1.4 Vías de entradas de agua y solutos a través de la raíz	
Figura 1.5 Cinética bifásica, se muestran los dos mecanismos de transporte de K <sup>+</sup> determinados por Epstein	
<b>Figura 1.6</b> Topología y tipos funcionales de canales selectivos a K <sup>+</sup> en plantas	
<b>Figura 1.7</b> Posibles transportadores y canales de K⁺ en células de la raíz de plantas 39	
Figura 1.8 Mutantes de <i>S. cerevisiae</i> y <i>E. coli</i> deficientes en los sistemas de transporte de K <sup>+</sup>	
<b>Figura 1.9</b> Estrategia experimental para la obtención y caracterización de CcHAK1, un transportador de K <sup>+</sup> de alta afinidad de raíz de chile habanero ( <i>C. chinense</i> Jacq.)	
Figura 2.1 Germinación de semillas de <i>C. chinense Jacq.</i> en recipientes con vermiculita. 64	
<b>Figura 2.2</b> Tratamiento en presencia o ausencia de K⁺	
Figura 2.3 Amplificación por RT-PCR del fragmento CcHAK1 a partir de raíces de chile habanero ( <i>C. chinense</i> Jacq.)	
Figura 2.4 Patrón de fragmentos obtenidos con la digestión de CcHAK1	
Figura 2.5 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de algunos transportadores de tipo HAK	
Figura 2.6 Árbol filogenético de la familia de transportadores KT/HAK/KUP	

Figura 2.7 Perfil de hidrofobicidad de CcHAK1
Figura 2.8 Predicción de los límites de los segmentos transmembranales de CcHAK1 83
Figura 2.9 Perfil de fosforilación de la proteína CcHAK1
Figura 2.10 Expresión de CcHAK1 en raíces de plántulas de <i>C. chinense</i> (Jacq.) crecidas en diferentes condiciones durante 10 días
Figura 3.1 Estrategia experimental para la caracterización funcional y bioquímica de CcHAK1
Figura 3.2 Ensayo de complementación de CcHAK1 100
Figura 3.3 Ensayo de complementación de CcHAK1 101
Figura 3.4 Curvas de crecimiento de cultivos de la cepa W∆3 transformada con el plásmido pYPGE15 vacio, con CcHAK1 y con CaHAK1
Figura 3.5 Entrada de K <sup>+</sup> en levaduras transformadas con el ADNc de CcHAK1 (W∆3- CcHAK1) y con el plásmido vacío (W∆3-p)
Figura 3.6 Entrada de K <sup>+</sup> y Rb <sup>+</sup> en levaduras transformadas con el ADNc de CcHAK1 (W∆3-CcHAK1)
<b>Figura 3.7</b> Concentración de Rb <sup>+</sup> interno en levaduras transformadas con el ADNc de CcHAK1 (W∆3-CcHAK1), suplementadas con 0.05, 0.1, 0.25, 0.50 y 1 mM Rb <sup>+</sup> 106
<b>Figura 3.8</b> Entrada de K <sup>+</sup> en levaduras transformadas con el ADNc de CcHAK1 (W∆3- CcHAK1) y con el ADNc de <i>Neurospora crassa</i> (NcHAK1)
Figura 3.9 Crecimiento de las levaduras transformadas con el ADNc de CcHAK1 (W∆3-
CcHAK1) en presencia de NH₄CI, CsCI y NaCI. W∆3-p: plásmido vacío
<b>Figura 3.10</b> Crecimiento de las levaduras transformadas con el ADNc de CaHAK1 (W∆3-CaHAK1) (Martínez-Cordero <i>et al.</i> , 2004) y CcHAK1 (W∆3-CcHAK1) en presencia de diferentes concentraciones de NaCl

Figura 3.11 Efecto CcHAK1	o del NH₄Cl y CsCl en la toma de K⁺ de alta afinidad de mediado por 110
Figura 3.12 Efecto	o del NaCl en la toma de K⁺ de alta afinidad mediado por CcHAK1… 111
Figura 3.13 Crecin con CcHAK1 v co	miento de la cepa W∆3 transformada con el plásmido pYPGE15 vacio, n CaHAK1
y biogramiyaa as Mi	Picture 3.4 Estantopic e confirmation perce a constanteration functions officer
	A new \$1.5 Evolutions 3(), or levelouse transformates and al ADN: (200787) = granting the KH_QII CaCl y HuQ2 W41-pr allowed a value.)

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1</b> Contenido de K <sup>+</sup> intercambiable y soluble en suelos del estado de Yucatán, México. Modificado de Borges-Gómez <i>et al.</i> (2005)
Cuadro 1.2 Clasificación del suelo según su contenido de K <sup>+</sup> . Urbano-Terrón. (2005) 8
Cuadro 1.3 Clasificación de los macronutrientes y micronutrientes. Wakeel et al. (2011). 9
Cuadro 1.4 Transporte a través de las membranas. Bidwell (1993)
Cuadro 2.1 Composición de la solución Hoagland (¹/₅ de su fuerza iónica) con y sin K <sup>+</sup> . 65
Cuadro 2.2 Oligonucleótidos específicos empleados para la amplificación de los extremos 5'y 3' mediante el protocolo de RACE
Cuadro 2.3 Oligonucleótidos específicos empleados para amplificar y secuenciar el ADNc total de CcHAK1
Cuadro 2.4 Contenido interno de K <sup>+</sup> en plántulas de <i>C. chinense</i> en ausencia y presencia de K <sup>+</sup>
<b>Cuadro 2.5</b> Transportadores de alta afinidad a K <sup>+</sup> que han sido clonados en diferentes especies de plantas. *Organismo en el que se ha realizado la caracterización funcional. 86
Cuadro 3.1 Medios utilizados para el cultivo de S. cerevisiae
Cuadro 3.2 Composición del medio fosfato de arginina utilizado para el crecimiento y los ensayos de complementación de CcHAK1
Cuadro 3.3 Comparación de identidad entre CcHAK1 y CaHAK1 (AY560009), SIHAK5 (DQ489721), OsHAK1 (AJ427970), HvHAK1 (AF025292), AtHAK5 (AF129478.1 y ThHAK (EF177193). Clustal W2 (http://www.ebi.ac.uk/Tool/ clustalw2/index.html)

# ABREVIATURAS

EGROADS BE CLARKER

A	Amstrong
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADNc	ADN complementario
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CPA	Transportadores antiporte próton/catión
cmol <sub>c</sub> Kg <sup>-1</sup>	Centimol por kilogramo
FA	Medio de cultivo Fosfato de Arginina
FA-U	Medio de cultivo Fosfato de Arginina menos uracilo
HATS	Sistema de transporte de alta afinidad
HAK/KUP/KT	Familia de transportadores de potasio de alta afinidad
нкт	Transportador de potasio de alta afinidad
Ki	Potasio inorgánico
Kir-like	Canales de rectificación entrante de potasio
Km	Constante de Michaelis-Menten
Ks	Potasio soluble
La tensiónul pièces	Litro es el cossiliser an as ous la religion antinego", estincia es e en este
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LAST	Sistema de transporte de baja afinidad
M	Molar
mg	Miligramo
μΜ	Micromolar
mM	Milimolar V DAMCO othe beblinebiled norostering D Co. SteelO
mV	Milivolts
nmol K <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> PS	Nanomoles de potasio por miligramo de peso seco
NHX	Intercambiador sodio/protón
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pHPotencial de hidrógenoppmPartes por millónTEATetraetilamonioTPKCanales de potasio con poro en tándemTRKTransportadores de potasio de alta afinidad de levaduraVmaxVelocidad máxima

2.466

The second second

100000000000





-

#### RESUMEN

(

Se aisló el ADNc correspondiente a CcHAK1 de raíces de *Capsicum chinense* Jacq., que codifica a un transportador de la familia KT/HAK/KUP. De acuerdo con los estudios filogenéticos, CcHAK1 se localiza dentro del grupo I de la familia. Los transcritos de CcHAK1 fueron detectados en raíces en ayuno de K<sup>+</sup>, y en presencia de NaCl. Se demostró que CcHAK1 media el transporte de alta afinidad a K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup> cuando es expresado en la mutante de levadura deficiente en este transporte (*Saccharomyces cerevisiae;* W $\Delta$ 3), con un valor de K<sub>m</sub> para Rb<sup>+</sup> de 50  $\mu$ M. La toma de K<sup>+</sup> fue completamente inhibida en presencia de concentraciones milimolares de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> y no en presencia de Na<sup>+</sup>.

### ABSTRACT

cDNA encoding CcHAK1, a transporter of the KT/HAK/KUP family, from *Capsicum chinense* Jacq. A phylogenetic study placed a CcHAK1 within group I of the family. CcHAK1 transcripts are detected in the roots of K<sup>+</sup>-starved plants and in plants growing in the presence of NaCI. CcHAK1 expressed in yeast mutant deficient in this transport (*Saccharomyces cerevisiae;* W $\Delta$ 3) mediated high-affinity K<sup>+</sup> and Rb<sup>+</sup> uptake, with K<sub>m</sub> value of 50  $\mu$ M for Rb<sup>+</sup>. The K<sup>+</sup> uptake was competitively inhibited by micromolar concentrations of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, but not in the presence of NaCI.

#### INTRODUCCIÓN

El potasio (K<sup>+</sup>), es un catión monovalente y se caracteriza por su alta movilidad a nivel de todos los tejidos vegetales, y es considerado como un nutriente esencial para todos los organismos vivos (Marschner., 1986). El K<sup>+</sup> comprende entre el 8 y 10% del peso seco total de la planta (Grabov, 2007; Gierth y Mäser, 2007; Martínez-Cordero *et al.*, 2005), está presente en todos los compartimentos de las células donde la vacuola y el citosol son sus almacenes principales.

Los análisis fisiológicos indican que los diferentes mecanismos de transporte de K<sup>+</sup>, tanto canales como transportadores, se caracterizan por su afinidad por éste, e involucran procesos de toma, transporte y compartamentalización de K<sup>+</sup> desde el suelo. Los genes candidatos para el transporte de K<sup>+</sup> identificados en el genoma de *Arabidopsis* revelan tres familias de transportadores de KT/HAK/KUP, TRK/HKT y familia antiportador protón catión (CPA). En este estudio nos enfocaremos en un miembro de la familia KUP/HAK/KT, los transportadores HAK, los cuales están presentes como una familia multigénica: en *Arabidopsis* se han reportado 13 genes, y al menos 27 en arroz han sido caracterizados mediante su expresión en sistemas heterólogos. (Grabov, 2007; Gierth y Pascal Mäser, 2007).

Nuestro interés es obtener el ADN complementario (ADNc) de un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad (HAK) de raíces de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), con el objetivo de caracterizarlo funcionalmente mediante su expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y determinar el mecanismo de toma de K<sup>+</sup> para este transportador.



# CAPÍTULO I

#### ANTECEDENTES

# 1.1 MODELO DE ESTUDIO: EL CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

En Yucatán, *Capsicum chinense* Jacq. es comúnmente llamado chile habanero. Este chile se encuentra distribuido en toda la Península de Yucatán, y en el cual los frutos se pueden observar diferentes formas, colores y tamaños (Ayala, 2002). Este cultivo tiene gran importancia económica para los productores de hortalizas en el estado de Yucatán y ocupa el segundo lugar, después del cultivo del tomate, en cuanto a superficie cultivada. La mayor superficie de cultivo se encuentra en la parte norte del estado y contribuye con más del 90% del volumen de la producción estatal, la cual se comercializa y se consume en fresco principalmente, una pequeña parte se utiliza en la industria como materia prima para la elaboración de salsas (Tun, 2001).

Esta especie puede cultivarse durante todo el año, siempre y cuando se le proporcione un riego adecuado. El rendimiento depende del manejo que se le dé al suelo y a los cultivos, ya que la planta puede seguir viva después de la segunda cosecha, pero tanto la producción como la calidad disminuyen (Tun, 2000; Soria *et al.*, 2002).

En el estado de Yucatán los suelos más apropiados para el desarrollo del chile, desde el punto de vista de productividad son los luvisoles de acuerdo a la clasificación FAO/UNESCO y que regionalmente se les conoce como K'an cab (Borges-Gómez *et al.*, 2005; INEGI, 2008).

#### **1.2 DIPSONIBILIDAD DEL POTASIO EN EL SUELO**

El K<sup>+</sup> disponible se forma a través del intemperismo de las rocas, por esto, en suelos orgánicos es posible encontrar el contenido más bajo de K<sup>+</sup> (< 0.03%). Las características del suelo que afectan la disponibilidad de minerales para las plantas incluyen: la roca



#### CAPÍTULO I

madre, el tamaño de las partículas, la cantidad de *humus* que contiene y el pH. Entre los principales factores que afectan la distribución de K<sup>+</sup> entre la fase sólida y líquida del suelo, se encuentran el contenido y tipo de arcilla (Barber, 1984). Esto se debe a que las fuerzas con que el K<sup>+</sup> es retenido varían con el tipo de arcilla y la posición del ión en la misma. Cuando más débil esté el K<sup>+</sup> retenido en la superficie de las arcillas, más fácil podrá ser liberado a la solución del suelo (Borges-Gómez *et al.*, 2005). Entre las formas de incorporación del K<sup>+</sup> al suelo son: mediante la adición de residuos vegetales, estiércoles, residuos animales sólidos y fertilizantes minerales (Barber, 1984).

Cantidades adecuadas de K<sup>+</sup> son importantes contribuyentes en la adaptación de los cultivos al estrés causado por factores bióticos y abióticos, tales como sequías, salinidad, heladas, ataques de insectos o enfermedades. Por lo tanto, la disposición de K<sup>+</sup> en el suelo es de vital importancia para su absorción, (Borges-Gómez *et al.*, 2005 y 2008), sin embargo, las concentraciones de K<sup>+</sup> en la solución del suelo no son muy altas y se encuentran en un rango entre 0.1 a 6 mM, dependiendo del tipo de suelo (Ashley, 2006; Cuin *et al.*, 2008).

Los suelos contienen K<sup>+</sup> en cuatro diferentes formas: intercambiable, soluble, fijo y mineral. La suma de estas cuatro formas resulta en el " K<sup>+</sup> total" que contienen los suelos. El K<sup>+</sup> intercambiable es el que se encuentra contenido en los sitios de intercambio de iones de las micelas del suelo (Barber, 1984). Como el K<sup>+</sup> está cargado positivamente (catión), es atraído por las cargas negativas de las partículas del suelo y se mantiene así hasta que es reemplazado por una atracción más fuerte (como el catión amonio, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). El K<sup>+</sup> soluble se refiere a los iones de K<sup>+</sup> que se encuentran en la solución del suelo (agua contenida en el suelo) y es inmediatamente disponible para las plantas. El K<sup>+</sup> fijado se refiere al K<sup>+</sup> iónico que está atrapado entre las capas de las arcillas y no es disponible para las plantas. Por último, el K<sup>+</sup> mineral no está inmediatamente disponible para las plantas ya que forma parte integral de las rocas y material original del suelo y requiere un proceso largo de intemperización que toma muchos años para transformarse a formas disponibles (Barber, 1984; Russell, 1992).

Por otro lado, se puede describir la fertilidad del suelo según Comerford (1999), como el "estatus del sistema suelo planta", definido por la capacidad para proporcionar los nutrimentos esenciales para el crecimiento de las plantas, a través de mecanismos de: i)

4

liberación de nutrientes de la fase sólida a la fase soluble del suelo, ii) movimiento de los nutrientes a través de la solución del suelo hacia las raíces de las plantas y iii) la absorción por las raíces (Borges *et al.*, 2008; Roldan *et al.*, 2004).

#### 1.3 EL POTASIO EN LOS SUELOS DE YUCATÁN

Yucatán se caracteriza por una diversidad edáfica, en la cual predominan los suelos del tipo Leptosoles, Rendzinas y Cambisoles, ubicados en la región centro y norte del estado. Hacia el sur y oriente del estado, se encuentran los suelos profundos (Luvisoles, Nitosoles, Vertisoles y Gleysoles), libres de afloramientos rocosos y piedras. Otros suelos son los asociados geográficamente con el litoral marino (Regosoles, Histosoles y Solonchács), los cuales se caracterizan por ser profundos, sin rocas, de color ligeramente amarillento o grisáceo, y con textura arenosa (Wilson, 1980; Duch, 1988). En general son suelos arcillosos, con alta pedregosidad y pH por lo general alcalino (7.5 a 8.5), ricos en materia orgánica, pobres en nitrógeno y fósforo y ricos en K<sup>+</sup> (INEGI, 2008). A pesar de que el K<sup>+</sup> total en el suelo es alto, la mayor parte de él está casi siempre en formas no asimilables encontrándose únicamente del 1 al 2 % del K<sup>+</sup> total en forma aprovechable en la solución del suelo o como intercambiable en los coloides (Borges *et al.*, 2006).

Los suelos del estado de Yucatán tienen bajas posibilidades de uso agrícola, por sus terrenos carbonatados y la presencia de los afloramientos rocosos (las tierras no aptas para la agricultura abarcan un 23.4%). El análisis de la disponibilidad K<sup>+</sup> para las plantas requiere de la estimación del movimiento del nutriente en la solución, desde la superficie de las partículas del suelo de la cual se liberan hasta las inmediaciones de la raíz. A medida que los cultivos remueven el K<sup>+</sup> de la solución del suelo, el K<sup>+</sup> intercambiable que se encuentra unido a las partículas del suelo se libera y repone el K<sup>+</sup> de ésta. Por medio de estos procesos de intercambio catiónico, el K<sup>+</sup> esta continuamente disponible para el crecimiento de las plantas; esto solo si el suelo contiene suficiente K<sup>+</sup> (Borges-Gómez *et al.*, 2005).

La adsorción de K<sup>+</sup> en las superficies de intercambio y su disponibilidad dependen de las características físico-químicas del suelo. Desde el punto de vista agrícola, el conocimiento

#### CAPÍTULO I

de las características físicas y químicas de los suelos de Yucatán para mejorar su aprovechamiento, ha sido insuficiente. A pesar de que los suelos de Yucatán son considerados ricos en K<sup>+</sup> mineral, éste no se encuentra disponible y por lo tanto, no puede ser absorbido por las plantas; Según Borges-Gómez et al., (2005) la disponibilidad de K<sup>+</sup> depende de su contenido en la solución del suelo, del adsorbido a los coloides del suelo y la capacidad del suelo para mantener una concentración de K<sup>+</sup> en solución. Éste grupo evaluó las fracciones soluble (K<sub>s</sub>) e intercambiable (K<sub>i</sub>) de K<sup>+</sup> en 16 suelos de Yucatán con potencial agrícola. Como resultado determinaron que los contenidos de K<sub>s</sub> y K<sub>i</sub> fueron diferentes entre los sitios de estudio (Cuadro 1.1). Esto se debe a que las fracciones de  $K_i$ dependen del material parental y su meteorización, así como del contenido y de la naturaleza de los coloides del suelo (Wang et al., 2004). El menor contenido de K<sub>i</sub> (0.769 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>) se encontró en el sitio Cacalchen (al norte de Yucatán), donde los suelos se caracterizan por ser superficiales y pedregosos. El contenido de K<sub>i</sub> se incrementó hacia el sur, donde los suelos son más profundos (Cuadro 1.1). Esto debido a que, los suelos superficiales son los más jóvenes y con menor contenido de K<sup>+</sup>, mientras que los suelos profundos del sur son los de mayor tiempo de formación y mayor contenido de K<sup>+</sup>. No obstante, por su contenido intercambiable mayor a 0.6 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> todos los suelos podrían clasificarse como ricos en K<sup>+</sup>.

De manera similar a lo que observaron con el contenido de K<sub>i</sub>, los contenidos más bajos de K<sub>s</sub> fueron reportados para el norte de Yucatán, en la zona de Leptosoles y Rendzinas (Telchac Pueblo 0.023 mM, Cacalchen 0.020 mM y Buctzotzs 0.072 mM); estos suelos, además de ser limitados en profundidad por la presencia de roca dura o material calcáreo, tienen un drenaje muy rápido, lo que ocasiona filtraciones de K<sup>+</sup> a capas más profundas y disminuye el contenido de K<sub>s</sub> en la capa superficial del suelo (Borges-Gómez *et al.*, 2005).

Tipo de suelo (Sistema FAO y localidad)		de suelo (Sistema FAO y localidad)	K <sub>sol</sub> (mM)	ES	K <sub>int</sub> (cmol <sub>c</sub> Kg <sup>-1</sup> )	ES*
	1.	Cambisol crómico (Akil)	0.069 fgh	0.005	0.997 g	0.006
	2.	Rendzina (Becanchen)	0.538 e	0.007	2.405 c	0.053
	3.	Cambisol calcárico (Buctzotz)	0.072 fgh	0.002	0.996 g	0.005
	4.	Rendzina (Cacalchen)	0.020 h	0.001	0.769 i	0.016
	5.	Leptosol (Celestún)	0.673 cd	0.017	2.345 c	0.019
	6.	Rendzina (Chemax)	0.196 f	0.003	0.911 h	0.012
	7.	Rendzina (El cuyo)	0.155 fgh	0.002	1.640 e	0.039
	8.	Luvisol vértico (Maxcanú)	0.782 c	0.005	1.865 d	0.004
	9.	Luvisol vértico (Peto)	0.915 b	0.017	2.490 b	0.029
	10. 11. 12.	Vertisol pélico (San Isidro) Rendzina (Tekit) Leptosol (Telchac pueblo)	0.734 c 0.064 gh 0.023 h	0.021 0.005 0.003	1.171 f 1.199 f 0.878 h	0.008 0.014 0.004
	13.	Rendzina (Temozón)	0.593 d	0.020	2.384 c	0.004
	14. 15. 16	Rendzina (Tizimin) Luvisol vértico (Tzucacab) Cambisol calcárico (Xul)	0.100 fgh 2.350 a 0.328 e	0.013 0.175 0.020	1.022 g 3.015 a 1.216 f	0.007 0.042 0.015

Cuadro 1.1 Contenido de K<sup>+</sup> intercambiable y soluble en suelos del estado de Yucatán, México. Modificado de Borges-Gómez *et al.* (2005).

Kaol: K<sup>+</sup> en la solución del suelo; Kint: K<sup>+</sup> intercambiable

Realmente no están bien establecidos los rangos de concentración de K<sup>+</sup> en los suelos para su clasificación, esto debido a que una concentración elevada de K<sup>+</sup> en los suelos no es indicativo de una alta disponibilidad para las plantas, siendo por lo general estas concentraciones mucho menores. Esto radica en que la concentración de K<sup>+</sup> en el suelo depende de factores como: el contenido y tipo de arcilla; la presencia de materia orgánica; la profundidad del suelo; los procesos de lixiviación, entre otros. Debido a esto, las concentraciones de K<sup>+</sup> encontradas en la solución del suelo son muy variables; se han registrado valores inferiores a 10<sup>-5</sup> M, pero las más frecuentes, en los suelos de agricultura intensa, están entre 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> M (Russell, 1992). Asimismo, Urbano-Terrón. (1995) estableció una clasificación de los suelos según su contenido de K<sup>+</sup> (Cuadro 1.2).

.

Partes por millón (ppm) (1ppm= 1 mg L <sup>-1</sup> )	Clasificación del suelo		
K <sup>+</sup> < 50	Muy pobre		
50 ≤ K <sup>+</sup> < 100	Pobre		
$100 \le K^+ < 150$	Medio		
K <sup>+</sup> ≥ 150	Rico		

**Cuadro 1.2** Clasificación del suelo según su contenido de K<sup>+</sup>. Urbano-Terrón. (2005).

### 1.4 EL POTASIO COMO ELEMENTO ESENCIAL

Un elemento es considerado esencial si: a) su deficiencia impide que la planta complete la fase vegetativa o reproductiva de su ciclo de vida, b) si su deficiencia no puede ser remplazada por otro elemento mineral o c) si se ha demostrado que realiza una función específica (Wakel *et al.*, 2011; Arnon y Stout, 1939). De acuerdo con Epstein y Bloom (2005) un elemento es esencial si cumple con uno de los siguientes criterios: 1) el elemento es parte de una molécula como componente intrínseco de su estructura o del metabolismo de la planta; y 2) la planta al ser privada severamente de este elemento presenta anormalidades en su crecimiento, desarrollo o producción en comparación con plantas que no son privadas de éste (Wakeel *et al.*, 2011).

Diecisiete elementos son considerados como nutrientes en las plantas. Basados en su concentración en la planta han sido divididos en macronutrientes (g Kg<sup>-1</sup>) y micronutrientes (mg Kg<sup>-1</sup>) (Wakeel *et al.*, 2011). Dentro de los macronutrimentos el K<sup>+</sup> es requerido en grandes cantidades en las plantas, pues desempeña numerosos papeles en el metabolismo (Bidwell, 1993) (Cuadro 1.3).

Macronutrient (>0.5 g/Kg plant dry weight)		Micronutrient (<0.5 g/Kg plant dry weight)	
н	Hydrogen	Mn	Manganese
0	Oxygen	Cu	Copper
N	Nitrogen	Zn	Zinc
P	Phosphorus	Мо	Molybdenum
K	Potassium	В	Boron
S	Sulfur	CI	Chlorine
Ca	Calcium	Ni	Nickel
Mg	Magnesium	(Na)	Sodium
(Si)	Silicon	(Co)	Cobalt

Cuadro 1.3 Clasificación de los macronutrientes y micronutrientes. Wakeel et al. (2011).

Los elementos en paréntesis no son considerados nutrientes, sin embargo son benéficos para algunas plantas (After Schubert, 2006)

El K<sup>+</sup> constituye del orden del 2.4% en peso de la corteza terrestre siendo el séptimo más abundante (Borges-Gómez *et al.*, 2005). Es un catión univalente cuyo símbolo es K<sup>+</sup>, con un número atómico de 19, una masa atómica de 39.09 uma (Wakel *et al.*, 2011) y un radio cristalino calculado por Paulining (1927, 1960) de 1.33 Å (Aidley y Stanfield, 2003; Hilie, 2001). El K<sup>+</sup> es uno de los iones absorbidos en mayor cantidad por las plantas (Schulze *et al.*, 2002); y desempeña un papel importante en el metabolismo de carbohidratos y proteínas, regula la transpiración y el contenido de agua de las células, es cofactor enzimático e interviene en la fotosíntesis (Borges-Gómez *et al.*, 2005; Roldan *et al.*, 2004).

#### 1.4.1 DISTRIBUCIÓN Y MOVILIDAD DEL POTASIO EN LAS PLANTAS

El K<sup>+</sup> comprende casi entre el 8 y 10% del peso seco total de la planta (Martínez-Cordero *et al.*, 2005; Grabov, 2007; Gierth y Mäser, 2007). En el citoplasma, es regulada y mantenida en 100 mM y no difiere entre células de la raíz u hoja. Por el contrario, el contenido vacuolar del K<sup>+</sup> varía entre los diferentes tipos de células, en rangos de ~120 mM en vacuolas de células de raíz (Walker *et al.*, 1996) a ~230 mM en las vacuolas de las células del mesófilo

en la hoja (Cuin *et al.*, 2003). La homeostasis del K<sup>+</sup> citoplásmico es esencial para los procesos metabólicos. Dos mecanismos están involucrados en el mantenimiento de la homeostasis: 1) el control del influjo de K<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática y 2) la movilización del K<sup>+</sup> de reserva a partir de vacuola (Walker *et al.*, 1996; Cuin *et al.*, 2003; Gierth y Mäser, 2007).

En cuanto a su movilidad, se conoce que el K<sup>+</sup> es muy móvil dentro de las plantas; desplazándose hacia arriba y hacia abajo por el xilema y el floema en dirección hacia los tejidos meristemáticos. La concentración de K<sup>+</sup> en el floema se encuentra aproximadamente en un rango de 60 a 100 mM (Mengel, 2007 citado por Wakeel et al., 2011). Esto indica que el K<sup>+</sup> se absorbe selectivamente por los vasos cribosos del floema v puede desplazarse fácilmente desde las partes superiores hacia los órganos basales de la planta, frutos y raíces. El movimiento del K<sup>+</sup> hacia arriba y hacia abajo puede entenderse mejor con el experimento de Pitman (1972) cuando plántulas de cebada fueron cultivadas en una solución que contenía K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>. Las hojas maduras tienden a acumular más Na<sup>+</sup> y las hojas jóvenes más K<sup>+</sup>. La hoja en su totalidad recibe iones desde el xilema y puede exportar  $K^{+}$  (preferentemente sobre el Na<sup>+</sup>) hacia el floema, que luego se mueve principalmente hacia las hojas más jóvenes así también como a las raíces. El equilibrio entre estos procesos determinará el nivel de los iones en las hojas. Por lo tanto, el movimiento del K<sup>+</sup> desde las hojas se realiza a toda la planta por el floema (Mengel y Kirkby, 1987). La traslocación y redistribución del K<sup>+</sup> ocurre desde las partes más maduras de la planta a las partes más nuevas que se van formando (Swya y Kafkafi, 2008). Martínez-Estévez et al. (2006) determinaron la dinámica y distribución de diferentes nutrientes, entre ellos el K<sup>+</sup> en hojas de chile habanero (C. chinense Jacq.). El K<sup>+</sup> presentó una movilización desde las hojas más maduras hacia las más jóvenes, acumulándose en estas últimas. Esta movilización del K<sup>+</sup> esta posiblemente relacionada con su función en el movimiento estomático.

#### 1.4.2 FUNCIONES BIOLÓGICAS

El K<sup>+</sup> está implicado en numerosas funciones del metabolismo vegetal por ejemplo: en la muerte celular programada, síntesis y activación de enzimas, balance catiónico/aniónico,
movimiento estomático, transporte del floema, traslocación de asimilados, y regulación de la turgencia para nombrar solamente algunos pocos (Wakeel *et al.*, 2011). Asimismo debido a sus altas concentraciones en el citosol y cloroplasto este neutraliza aniones, macromoleculares solubles (aniones ácidos orgánicos y aniones inorgánicos) é insolubles y estabiliza el pH entre 7 y 8 en estos compartimentos, el óptimo para la mayoría de las reacciones enzimáticas (Cuin y Shabala, 2006; Bidwell, 1993).

#### 1.4.2.1 MUERTE CELULAR PROGRAMADA

La "muerte celular programada" (MCP) o apoptosis, es un mecanismo importante en la vida de todos los organismos multicelulares, ya que se contrapone al mecanismo de proliferación celular. Tanto la proliferación como la apoptosis definen la organogénesis y la homeostasis tisular; por otro lado el desbalance entre estos dos mecanismos genera una gran variedad de patologías. La apoptosis se define morfológicamente por el encogimiento del citoplasma, condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo y de la célula, todas estas transformaciones son el resultado de los cambios bioquímicos que ocurren en la célula en respuesta al estímulo apoptótico (Fadeel y Orrenius, 2005). Un evento inicial durante la apoptosis es el movimiento de iones intracelulares, disminuye la concentración de K<sup>+</sup> y aumenta la concentración de Na<sup>+</sup> (Bortner *et al*, 2003; Bortner y Cidlowski 2003); cambios que contribuyen a la reducción apoptótica del volumen o encogimiento celular y a la activación de la fase de ejecución. Los iones de K<sup>+</sup> durante la MCP intervienen en la disminución del volumen celular apoptótico (Pérez *et al.*, 2007; Yu, 2003).

La MCP es esencial para mantener la homeostasis tisular en muchas formas de vida. En las plantas, de igual forma que la apoptosis en los animales, la MCP es el mecanismo por el cual se regulan una serie de procesos fisiológicos tales como la germinación, diferenciación, crecimiento, reproducción y desarrollo de semillas. Hay similitudes generales entre la apoptosis y la MCP en plantas, tales como condensación del citoplasma, activación de proteasas y nucleasas, degradación del ADN nuclear en fragmentos nucleosomales, la implicación del Ca<sup>2+</sup> y la generación de especies reactivas de oxigeno. Sin embargo hay diferencias particulares en las plantas, tales como la

presencia de una pared celular que impide la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, cuya respuesta evolutiva ha sido la generación de una extensiva vacuolización del citoplasma, donde las enzimas hidrolíticas se encargan de ir digiriendo los restos celulares (Pérez *et al.*, 2007)

# 1.4.2.2 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS Y ACTIVACIÓN DE ENZIMAS

El K<sup>+</sup> es requerido para la síntesis y activación de enzimas (nitrato reductasa, almidón sintasa, entre otras) (Figura 1.1). Existen alrededor de 60 enzimas cuya actividad puede depender de la presencia del K<sup>+</sup>. El K<sup>+</sup> y otros cationes monovalentes se unen de manera electrostática a la superficie de la enzima generando cambios conformacionales en la molécula exponiendo el sitio activo para la reacción (Wakeel *et al.*, 2011), en general estos incrementan la velocidad de reacción, V<sub>max</sub>, y en algunos casos aumentan la afinidad por el sustrato, K<sub>m</sub> (Marschner, 1986). *In vitro*, la activación de enzimas ocurre en presencia de 50 a 100 mM de K<sup>+</sup>, un valor que va de acuerdo con las concentraciones citoplásmicas. La unión del K<sup>+</sup> a la enzima es en forma deshidratada, probablemente a través de la unión con seis átomos de oxigeno que pueden derivar de los grupos carboxilo, carbonilo o hidroxilo a partir de las moléculas de agua. Esta unión es muy selectiva para el K<sup>+</sup> y no puede ser sustituida por otros iones similares, tales como el Na<sup>+</sup> o Li<sup>+</sup> (Maathuis, 2009)

La función del K<sup>+</sup> en la síntesis de proteínas se demuestra en la acumulación de los compuestos solubles de nitrógeno (aminoácidos, amidas y nitrato) en plantas con déficit de este catión. Esto puede ser demostrado directamente por medio de la incorporación de <sup>15</sup>N inorgánico marcado dentro la fracción proteica. En plantas de tabaco colocadas durante cinco horas en presencia y deficiencia de K<sup>+</sup>, el 32% y 11%, respectivamente del total de N ha sido incorporado dentro de la proteína; probablemente el K<sup>+</sup> no solo activa la nitrato reductasa sino también es requerido para la síntesis de esta enzima (Marschner, 1986). Enzimas específicas han demostrado ser activadas por el K<sup>+</sup>, incluso isoformas de la PPasa vacuolar que acumula protones en el lumen vacuolar y son estrictamente dependientes de K<sup>+</sup>. También, enzimas implicadas en el metabolismo del carbono tales como la piruvato cinasa y fosfofructocinasa han demostrado dependencia de K<sup>+</sup>. La

síntesis de proteínas mediada por los ribosomas es otro proceso que requiere de altas concentraciones de K<sup>+</sup> (Maathuis, 2009; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006).

Nitsos y Evans (1969) comprobaron en plantas de maíz, que la actividad de la almidón sintasa es altamente dependiente de un catión monovalente, y el K<sup>+</sup> es el más efectivo. Esta enzima cataliza la transformación de glucosa en almidón. Por lo tanto, ante un déficit de K<sup>+</sup>, los niveles de almidón declinan así como la acumulación de carbohidratos solubles (Wakeel *et al.*, 2011). Por otro lado, en tejidos de plantas con deficiencia de K<sup>+</sup> han presentado una mayor actividad en ciertas hidrolasas como la β-glucosidasa u oxidasas como la polifenol oxidasa al compararlos con tejidos de plantas normales. No es claro si este cambio en la actividad enzimática es causado directamente o indirectamente por una deficiencia de K<sup>+</sup> en los tejidos (Marschner, 1986).

La transcripción y traducción, pasos de la síntesis de proteínas, serian imposibles sin una fuente de K<sup>+</sup> adecuada para la planta. Su participación radica en la unión del ARNt al ribosoma para la síntesis de proteínas (Wakeel *et al*, 2011).

Otra función del K<sup>+</sup> es la activación de las bombas H-ATPasas unidas a las membranas, las cuales requieren Mg<sup>2+</sup> pero son fuertemente estimuladas por K<sup>+</sup>. La activación de las ATPasas por el K<sup>+</sup> no solo facilita el transporte del catión desde el espacio extracelular hacia el interior de las células radicales, sino que convierte al K<sup>+</sup> en el elemento mineral en la extensión celular y osmoregulación (Marschner, 1986).

#### 1.4.2.3 BALANCE DE CARGAS

Todas las células del organismo mantienen una diferencia de potencial eléctrico (voltaje) a través de la membrana. Este "potencial de membrana" se debe a una pequeña diferencia de distribución de cargas a un lado y otro de la membrana. Estas diferencias en la distribución iónica se generan cuando un ión se difunde siguiendo su gradiente de concentración y debido a la permeabilidad selectiva para las especies iónicas. El potencial de membrana se encuentra entre -70 a -90 mV (Marschner, 1986).

La diferencia electroquímica entre el citosol y el medio exterior es decisivo para el

transporte de iones en la célula (Wakeel *et al.*, 2011). El K<sup>+</sup> es clave en la regulación homeostática de la diferencia de potencial eléctrico de la membrana plasmática. La concentración externa de K<sup>+</sup> provoca cambios en el potencial debido a su transporte, si aumenta la concentración externa de K<sup>+</sup> se produce la entrada de este catión a la célula provocando la despolarización de la membrana y al disminuir la concentración externa se produce la salida del mismo de la célula lo que origina la hiperpolarización de la membrana (Britto y Kronzuker, 2008). El K<sup>+</sup> entra a la célula cuando el potencial electroquímico es menor en el citosol con respecto al medio exterior. Con ésta entrada, aumenta el potencial electroquímico y se alcanza el equilibrio (Mengel y Kirkby, 1980). La carga negativa del citosol es mantenida por la actividad de las bombas de protones que liberan iones H<sup>+</sup> del citosol al apoplasto manteniendo negativo el potencial de membrana en un rango de 120-200 mV. El K<sup>+</sup> juega un papel importante en el transporte de agua, nutrientes, metabolitos y fitohormonas a través del xilema y el floema. Cuando el suministro de K<sup>+</sup> se reduce, los procesos de traslocación están abatidos (Chrispeels *et al.*, 1999; Wakeel *et al.*, 2011).

Los fotoasimilados son generados en las células fotosintéticas y posteriormente son incorporados a la corriente floemática. La sacarosa durante su transporte por el floema pasa al apoplasto del mesófilo; esta salida es favorecida por la concentración de K<sup>+</sup> en el apoplasto. Desde allí se incorpora al simplasto en la célula acompañante o en el elemento criboso por cotransporte activo, facilitado por una ATPasa de membrana que expulsa H<sup>+</sup> y provoca la entrada de K<sup>+</sup> al simplasto. La participación del K<sup>+</sup> en la carga de sacarosa al floema ha sido estudiada en caña de azúcar (Hartt, 1969), sauce (Peel y Rogers, 1982) y frijol (Cakmak et al., 1994). En estos reportes se sugiere que el aumento de la concentración apoplástica de sacarosa es posiblemente estimulada mediante el eflujo K<sup>+</sup>sucrosa a partir del mesófilo (Schobert et al., 1998). Por otro lado, Mengel (2007) menciona que particularmente la sacarosa es llevada hacia las células cribosas a un mayor pH apoplástico por cotransporte. Por lo tanto, en una insuficiencia de H<sup>+</sup> el K<sup>+</sup> puede sustituirlo y así llevar a cabo el transporte de metabolitos importantes requeridos para el crecimiento y almacenamiento. La concentración de K<sup>+</sup> en el floema oscila en rangos de 60-100 mM (Mengel, 2007, citado por Wakeel et al., 2011). Se ha demostrado que algunos iones inorgánicos pueden afectar el mecanismo de carga de sacarosa al floema; así mismo, Schobert (1998) sugiere que en plántulas de Ricinus communis L. iones como el K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, inhiben el flujo simplástico de la sacarosa de las células del mesófilo al floema. En ausencia de sacarosa externa, detectaron una estimulación ligera del flujo de sacarosa dentro del apoplasto estimulada por el K<sup>+</sup> y el Na<sup>+</sup>, corroborando un aumento en la concentración apoplástica de sacarosa en presencia de un elevado K<sup>+</sup> (Doman y Geiger, 1979) o la estimulación del flujo de sacarosa del mesófilo por el K<sup>+</sup> (Huber y Moreland, 1981).

#### 1.4.2.4 OTRAS FUNCIONES DEL POTASIO

El K<sup>+</sup> en las plantas superiores afecta la fotosíntesis en varios niveles (Marschner, 1986). Se ha demostrado el papel del K<sup>+</sup> en la fijación de CO<sub>2</sub> mediante cloroplastos aislados. Un aumento en la concentración externa de K<sup>+</sup> (100 mM), estimula la fijación de CO<sub>2</sub> tres veces más en cloroplastos de plantas de espinaca (Pflüger y Cassier, 1977). En plantas C<sub>3</sub> la RUBISCO carboxilasa es la proteína mayoritaria en el cloroplasto. Por consiguiente la síntesis de esta enzima se ve reducida en ausencia de K<sup>+</sup> y se ve estimulada en presencia del mismo (Marschner, 1986).

Para que la expansión celular se lleve a cabo hay dos requerimientos: 1) un aumento en la extensibilidad de la pared celular y 2) la acumulación de solutos para incrementar el potencial osmótico. La acumulación de K<sup>+</sup> en la vacuola origina como consecuencia la extensión celular, la cual es requerida para estabilizar el pH en el citoplasma e incrementar el potencial osmótico en la vacuola. Sin embargo, el K<sup>+</sup> no es el único componente que está involucrado en éste proceso, sino que se encuentra asociado con ácidos orgánicos (Marschner, 1986). Asimismo, es considerado como el responsable de los cambios de turgencia en las células guarda (oclusivas) durante el movimiento estomático (Marschner., 1986) (Figura 1.1). La turgencia de estas células aumenta o disminuye por el movimiento del agua, que sigue al movimiento de iones K<sup>+</sup> (incremento de concentración) hacia dentro o hacia afuera de las células guarda (Marschner, 1986). El cierre estomático puede ser inducido por el ácido abscísico (ABA) y está asociado con una pérdida de K<sup>+</sup> y aniones acompañantes de las células guarda (Marschner, 1986; Pandey *et al.*, 2007). La apertura de los canales aniónicos ha sido propuesta como la mayor fuerza motriz para este proceso. La activación de los canales aniónicos es

# CAPÍTULO I

precedida de la despolarización de la membrana, la cual ocurre después de la percepción de ABA, y un coordinado eflujo de aniones y el eflujo de K<sup>+</sup>. Se ha demostrado que ABA activa una corriente lenta de aniones en células guarda intactas de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotian tabacum* y *Vicia faba* y en protoplastos de *Arabidopsis* (Angeli *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2007). El ABA no solo provoca el cierre de los estomas, sino que inhibe la apertura estomática provocando el aumento del Ca<sup>2+</sup> citosólico causando la despolarización de la membrana (Angeli *et al.*, 2007). Este cambio en el potencial de membrana desactiva los canales rectificadores entrantes de K<sup>+</sup> (K<sup>+</sup><sub>in</sub>) y activa los canales rectificadores salientes de K<sup>+</sup> (K<sup>+</sup><sub>out</sub>), lo cual lleva a una salida neta de K<sup>+</sup> de las células guarda. La salida sostenida de aniones y K<sup>+</sup> de las células guarda contribuye a la pérdida de turgencia y lleva al cierre estomático. En sus funciones osmóticas el K<sup>+</sup> vacuolar puede ser reemplazable en un grado variable por otros cationes (Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) o solutos orgánicos (azúcares) (Pandey *et al.*, 2007).



**Figura 1.1** El K<sup>+</sup> es introducido a través de canales (AKT) y transportadores (HAK). Neutraliza las cargas negativas de los ácidos nucleicos (1) y proteínas (2); activa enzimas específicas (3); mantiene la turgencia en vacuola (4); apertura y cierre de estomas (5). Modificado de Maathius (2009).

# 1.5 MECANISMOS DE TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

La membrana celular es una barrera que separa dos medios acuosos, el extracelular y el intracelular, regulando su composición. Las características estructurales y funcionales de las membranas biológicas, y por tanto también del plasmalema, determinan la capacidad de las células de acumular y excluir iones y otras moléculas en condiciones alejadas del equilibrio, por lo que mantiene un ambiente interno controlando el paso de sustancias hacia el interior o exterior de la célula; se dice entonces que tiene permeabilidad selectiva (Torres y González, 2004). Moléculas hidrofílicas como aminoácidos, carbohidratos. proteínas e iones, no se difunden a través de la membrana, pero permite la difusión pasiva de moléculas hidrofóbicas (Figura 1.2). Los iones son moléculas hidrofílicas inmiscibles en los lípidos de la membrana y para atravesarla requieren de mecanismos específicos de transporte, estas son proteínas integrales de membrana que actúan como transportadores, transfiriendo a las moléculas hacia uno y otro lado de la membrana sin que entren en contacto con su interior hidrofóbico (Figura 1.2). Iones como el sodio (Na<sup>+</sup>) y el cloruro (CI), son bastante pequeños, en solución acuosa se encuentran rodeados por moléculas de agua y, tanto el tamaño como las cargas de los agregados resultantes impiden que atraviesen la membrana. Éste control permanente de intercambio de sustancias es esencial para proteger la integridad de cada célula, para mantener las muy estrictas condiciones de pH y concentraciones iónicas que permiten el desarrollo de sus procesos metabólicos y la coordinación de sus actividades (Torres y González, 2004).

\*

# CAPÍTULO I



Figura 1.2 Permeabilidad de la membrana plasmática. Modificado de Torres y González. (2004) y Bidwell (1993).

Existen, sin embargo, muchos factores que determinan el tipo de mecanismo mediante el cual las distintas moléculas atravesarán dicha membrana y pueden ser mecanismos de transporte pasivo y activo (Cuadro 1.4). El transporte iónico, tanto pasivo como activo, requiere energía, física en el primer caso y metabólica en el segundo. La energía metabólica generada por la célula es transformada en energía útil para el transporte activo mediante la actividad de las denominadas bombas primarias (Bidwell, 1993; Maathius y

Sanders, 1992).

Entre los mecanismos de transporte pasivo se encuentran:

- Difusión simple: sólo las moléculas pequeñas sin carga pueden difundir libremente a través de la bicapa lipídica. Las moléculas pequeñas no polares, tales como O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, son solubles en la bicapa lipídica y por lo tanto pueden cruzar fácilmente las membranas. Las moléculas pequeñas polares sin carga, tales como el agua, pueden también difundir a través de las membranas, pero moléculas polares sin carga y más grandes, tales como la glucosa, no pueden (Cuador 1.4) (Bidwell, 1993).
- Difusión facilitada: las moléculas que no pueden cruzar la membrana por libre difusión, pueden hacerlo por la acción de proteínas de transmembranales específicas, que actúan como transportadoras. Existen dos tipos de proteínas transportadoras: los canales, los cuales una vez abiertos, forman pequeños poros a través de los cuales los iones de tamaño y carga apropiada pueden cruzar la membrana por difusión libre; y los transportadores, los cuales se unen a moléculas específicas y luego sufren cambios conformacionales para permitir el paso de la molécula que va a ser transportadas (Cuadro 1.4) (Bidwell, 1993).

En los casos anteriores el flujo neto de moléculas está inclinado en la dirección energéticamente favorable, pero, en muchos casos las células deben transportar moléculas en contra de un gradiente de concentración, tal es el caso del transporte activo primario (Figura 1.3). Aquí, la energía metabólica generada por la célula es transformada en energía útil para el transporte activo mediante la actividad de las denominadas bombas primarias. Estas bombas son proteínas de membrana que mueven iones en contra de su gradiente electroquímico aprovechando para ello la energía metabólica (ATP, PPi) (Figura 1.3). Como consecuencia de su actividad continua, dicho gradiente electroquímico se mantiene, suponiendo la acumulación de energía a nivel de membrana disponible para el denominado transporte secundario. Las principales bombas primarias de las células vegetales son las denominadas bombas de protones (ATP fosfohidrolasa de protones o H<sup>+</sup>-ATPasa (Palmgren, 2001).

Cuadro 1.4 Transporte a través de las membranas. Bidwell (1993).

TIPOS DE TRANSPORTE			
Transporte activo		Transporte pasivo	
Primario	Secundario	Difusión simple	Difusión facilitada
Bombas	Transportadores	Paso libre a través de la membrana	Paso a través de canales

Además de la H<sup>+</sup>-ATPasa, las plantas poseen en el plasmalema un segundo tipo de bomba primaria. Se trata de una Ca<sup>2+</sup>-H<sup>+</sup> ATPasa, que saca Ca<sup>2+</sup> del citoplasma al tiempo que incorpora H<sup>+</sup> en un proceso igualmente dependiente de ATP (Sze *et al.*, 1977). Sin embargo, la contribución de esta bomba a la acumulación de energía en el plasmalema es muy pequeña ya que, además de ser menos electrogénica que la H<sup>+</sup>-ATPasa, es mucho menos activa que ésta. Su función es evacuar Ca<sup>2+</sup> del citoplasma para mantener su concentración en torno a 0,1  $\mu$ M en este compartimento celular.

Por otra parte, en el tonoplasto se localizan dos tipos de bombas de protones (Maathuis y Sanders, 1992), una de ellas con actividad ATPasa y la otra con actividad pirofosfatasa (H<sup>+</sup>-PPasa). Esta última cataliza el transporte de H<sup>+</sup> al interior de la vacuola (pH interno próximo a 5 y potencial de membrana entre 5 y 20 mV) usando pirofosfato (PPi) como fuente de energía. Esta enzima es exclusiva de las plantas y para su actividad requiere la presencia de Mg<sup>2+</sup> (Maathuis y Sanders, 1992).

El transporte secundario consume la energía acumulada en las membranas por las bombas primarias. A diferencia del transporte primario, que genera una diferencia de potencial eléctrico y es, por tanto, electrogénico, el transporte secundario disipa la diferencia de potencial acumulada en la membrana y es, por tanto, electroforético (Bidwell, 1993). Las proteínas transportadoras (canales y transportadores) presentan dos mecanismos de transporte de iones o moléculas. El más simple es conocido como uniporte, un soluto en particular se mueve directamente a través de la membrana en una dirección. El otro mecanismo es el cotransporte y puede ser de tipo simporte, en donde dos solutos diferentes se mueven a través de la membrana simultáneamente y en el mismo sentido y el tipo antiporte, en donde dos solutos diferentes se mueven a través de la membrana en dirección opuesta. Frecuentemente, un gradiente de concentración, que involucra a uno de los solutos transportados, impulsa el transporte del otro. (Figura 1.3) (Cuin *et al.*, 2008).



Figura 1.3 Mecanismos de transporte a través de proteínas transportadoras. a) Transporte activo primario: bomba de protones (proporciona el gradiente electroquímico). Transporte activo secundario (transportadores): b) Antiporte: movimiento de dos moléculas en dirección opuesta; c) Simporte: movimiento de dos moléculas en la misma dirección y d) Transporte pasivo (canales): Uniporte: movimiento de una sola molécula. Modificado de Cuin *et al.* (2008).

# 1.6 TRANSPORTE DE IONES A TRAVÉS DE LA PLANTA

A nivel de organismos, las plantas han desarrollado cambios anatómicos y fisiológicos para el control del transporte de iones y agua así como, la distribución de estos a nivel de los tejidos y del organismo entero. Por lo tanto, el transporte de iones puede ser a larga o corta distancia. El transporte a larga distancia, se da cuando los iones son arrastrados por la corriente de agua que genera el flujo de transpiración, yendo desde un mayor potencial hídrico a un menor potencial hídrico y son distribuidos por toda la planta a través del xilema. En cuanto al transporte a corta distancia se da a través de la raíz y tiene lugar por medio de dos vías: la apoplástica y la simplástica (De Boer y Volkov, 2003).

De acuerdo con el modelo conceptual del transporte de agua y solutos a nivel de la raíz, la absorción de iones y agua en este órgano tiene lugar principalmente en el plasmalema de las células epidérmicas y corticales de la raíz. Posteriormente son transportados vía simplasto a través de los plasmodesmos de las células adyacentes, hasta tas células de la estela, siendo liberados a los vasos del xilema, vía apopiasto a través cel plasmalema de las células de la estela o, directamente, desde las células parenquimáticas del xilema (Figura 1.4) (De Boer y Volkov, 2003). La ruta apoplástica, otra vía de entrada de agua e iones está conformada por las paredes celulares de las células de la raíz. Esta ruta, de difusión pasiva y por lo tanto, no selectiva, puede interrumpirse a partir de la zona de diferenciación de la raíz, debido a la presencia de la banda de Caspary, restringiendo el paso de iones y agua, forzando la entrada al simplasto de la estela a través del plasmalema de estas células (Figura 1.4) (De Boer y Volkov, 2003).

Constant mental (a spectra of a state a stream of a stream of a state of a spectra of a spect



Figura 1.4 Vías de entradas de agua y solutos a través de la raíz. El movimiento se realiza a través de plasmodesmos (vía simplástica) y a través de las membranas plasmáticas (apoplástica). Taiz (2006).

# 1.6.1 MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA TOMA Y TRANSPORTE DE POTASIO EN PLANTAS

El K<sup>+</sup> se mueve desde la solución del suelo hacia la superficie de la raíz por difusión o por flujo de masas (Cuin *et al.*, 2008). La absorción de K<sup>+</sup> por la raíz se produce a través de los pelos radicales que son células epidérmicas especializadas que aumentan la superficie de contacto con la solución del suelo, así como a través de las células de la

## CAPÍTULO I

epidermis de la raíz, éste llega hasta la estela donde se encuentran los vasos xilemáticos y traqueidas. Estos vasos xilemáticos son los encargados del transporte de K<sup>+</sup> hacia la parte aérea, donde nuevamente tendrá que ser conducido a través de los distintos tejidos a todas las células de la planta. Para poder llegar a las células de la estela, el K<sup>+</sup> atraviesa los tejidos de la raíz camino al xilema por las rutas apoplástica y simplástica. En la ruta apoplástica el K<sup>+</sup> circula por el apoplasto, es decir, por la pared celular y entre los espacios intercelulares. Esta ruta queda impedida al llegar a la banda de Caspary. Esta banda, que se extiende longitudinalmente alrededor de la estela y que está compuesta mayoritariamente de lignina y suberina, ejerce la función de barrera hidrofóbica impermeable en la matriz intracelular, limitando por tanto el paso de K<sup>+</sup> hasta el xilema. Por la ruta simplástica, transcurre por el simplasto (citoplasma interconectado por plasmodesmos). Como la banda de Caspary impide la ruta apoplástica, la posibilidad para que el K<sup>+</sup> llegue a los vasos del xilema es por la vía simplástica (Figura 1.4). Esto implica que en algún punto el nutriente tiene que atravesar la membrana plasmática. Debido a que la membrana plasmática es impermeable por su naturaleza lipídica, la entrada de éste en el simplasto se produce a través de proteínas de membrana como canales y transportadores que constituyen los sistemas de transporte de  $K^+$  (Alemán, 2009).

Análisis fisiológicos indican que los diferentes mecanismos de transporte difieren en su afinidad por el K<sup>+</sup>, y envuelven proceso de toma de K<sup>+</sup> desde el suelo, transporte y compartamentalización. Se conocen dos mecanismos de incorporación de K<sup>+</sup> con distintas características cinéticas los cuales residen en la membrana plasmática. Es la denominada cinética bifásica de incorporación del K<sup>+</sup> (Epstein *et al.*, 1973) (Figura 1.5). Por un lado, un sistema de alta afinidad (mecanismo I), que se satura en función de la concentración de K<sup>+</sup> en el rango micromolar y que introduce K<sup>+</sup> en el citoplasma en contra de su gradiente de potencial electroquímico (Epstein *et al.*, 1973; Grierth y Mäser, 2007; Britto y Kronzucker, 2008). Este mecanismo probablemente representa la vía dominante de incorporación de K<sup>+</sup> en la mayoría de suelos, donde la concentración de K<sup>+</sup> no excede normalmente 1 mM.

Como la energética de la membrana plasmática se basa en la creación de un gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> mediante una bomba de H<sup>+</sup> que hidroliza ATP. Dicho gradiente es utilizado para el transporte de K<sup>+</sup> en contra de su gradiente electroquímico (Alemán,

2009). Por otro lado, un sistema de baja afinidad (mecanismo II), que normalmente no se satura en función de la concentración externa de K<sup>+</sup>, es específicamente inhibido por bloqueadores de canales de K<sup>+</sup>, y no parece estar energizado (Britto y Kronzucker, 2008). Este mecanismo constituye el modo dominante de incorporación de K<sup>+</sup> a concentraciones externas de K<sup>+</sup> mayores de 0.5 - 1 mM. En el primer caso, por tanto, el mecanismo de alta afinidad desarrollaría un transporte activo secundario (en contra del gradiente de concentración), mientras que el de baja afinidad consistiría en un transporte pasivo (a favor del gradiente de concentración) (Britto y Kronzucker, 2008; Grierth y Mäser, 2007; Epstein *et al.*, 1973)

En relación con los mecanismos de transporte generales antes descritos, el transporte activo de K<sup>+</sup> ha sido tradicionalmente asociado a la actividad de transportadores, proponiéndose como probable mecanismo un simporte K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Kochian y Lucas, 1988), dado que las principales bombas primarias en las células vegetales son H<sup>+</sup>-ATPasas. Mientras, el transporte pasivo de K<sup>+</sup>, por sus características, ha sido tradicionalmente vinculado a la actividad de canales

Por otro lado análisis moleculares han demostrado en *Arabidopsis* se reportan 35 genes que codifican para sistemas de transporte de  $K^{+}$ , los cuales forman tres familias de canales y tres de transportadores, con un total de 15 y 20 genes respectivamente (Lebaudy *et al.*, 2007).

## CAPÍTULO I



**Figura 1.5** Cinética bifásica, se muestran los dos mecanismos de transporte de K<sup>\*</sup> determinados por Epstein. El mecanismo I (alta afinidad; rango μM) y el mecanismo II (baja afinidad; rango mM). Gierth y Mäser. (2007).

#### **1.6.2 CANALES PERMEABLES A POTASIO**

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman una vía para el flujo de iones inorgánicos a través de la membrana celular. El movimiento de los iones es pasivo, es decir, los iones fluyen en contra del gradiente electroquímico, a favor de la fuerza de arrastre por medio de difusión. Una de las características de los canales es que presentan selectividad iónica, que se refiere a la naturaleza discriminatoria de las vías de conducción iónica, lo que les permite escoger cuales iones permean y cuáles no, el paso de los iones es a través de poros acuosos. Estos están abriéndose y cerrándose continuamente a una elevada velocidad. A esta propiedad de abrirse y cerrarse se la

denomina *gating* y la probabilidad de apertura refleja la actividad del canal. El transporte a través de un canal implica la unión del ión a un sitio específico de la proteína transportadora y su posterior desunión del mismo (Kumpf y Dougherty, 1993).

Los canales permeables a K<sup>+</sup> representan el grupo más numeroso, heterogéneo y ubicuo de proteínas integrales de membrana que facilitan el movimiento de iones a través del gradiente electroquímico (Figura 1.6). El transporte a través de los canales es siempre pasivo y se cree que son transportadores de iones de baja afinidad con gran capacidad de transportar alrededor de 10<sup>8</sup> moléculas por segundo. Estos canales no permanecen abiertos por periodos prolongados, pero tienen un sistema denominado "gates" o puerta que abre y se cierra el poro del canal en respuesta a señales externas, como el voltaje, pH y ciertos iones (Lebaudy, 2007).

En las células excitables, la apertura de los canales de K<sup>+</sup> facilita la salida de este catión a favor de su gradiente electroquímico y juega un importante papel en el mantenimiento del potencial de reposo celular. Se han establecido en *Arabidopsis* tres familias de canales selectivos a K<sup>+</sup> los tipo Shaker, los TPK (tipo KCO) y los Kir-like.

En cuanto a su topología presentan de dos a seis dominios transmembranales (subunidad  $\alpha$ ) y de 1 a 2 poros, por subunidad  $\alpha$ . Los canales tipo Shaker (topología y función similar a canales dependientes de voltaje con seis segmentos transmembranales en animales) presentan en la cuarta región transmembranal residuos básicos que funcionan a modo de sensor de voltaje; y entre las regiones quinta y sexta, se localiza el denominado dominio que participa en la constitución final del poro (dominio P) y que presenta residuos implicados en la selectividad del canal (motivo TxxTxGYGD, presente en todos los canales selectivos para el K<sup>+</sup>) (Lebaudy *et al.*, 2007). En el dominio C-terminal, localizado en el citoplasma, se han identificado sitios de unión para nucleótidos cíclicos y la región denominada KHA, rica en aminoácidos ácidos hidrofóbicos, y que podría estar implicada en la tetramerización del canal (Daram *et al.*, 1997) o en la inserción del mismo en la membrana (Ehrhardt *et al.*, 1997).

En los canales TPK (Two-pore K<sup>+</sup> o tándem pore K<sup>+</sup>) y Kir-like (inwardly rectifying K<sup>+</sup>), se ha identificado, aunque no en todas las secuencias analizadas, una región denominada dominio EF que probablemente permita la unión de Ca<sup>2+</sup> (Czempinski *et al.*, 1997). Los

27

canales TPK (tipo KCO), canales de rectificación saliente activados por Ca<sup>2+</sup> se caracterizan por consistir en un dímero, cada subunidad presentando cuatro regiones transmembranales y dos dominios P. Mientras que los canales Kir-like presentan un solo dominio P al igual que los canales tipo Shaker (Lebaudy *et al* 2007; Czempinski *et al.*, 1997) (Figura 6). Por lo tanto, para que se forme el poro y el canal sea funcional los canales tipo Shaker y Kir-like necesitan de cuatro subunidades alfa y los canales TPK solo dos.

En *Arabidopsis* se han reportado nueve miembros para los canales tipo Shaker y cinco para los TPK. Algunos canales como tipo Shaker son sensibles a voltaje, por lo que presentan un sensor de voltaje en el cuarto domino transmembranal. Sin embargo, no todos los canales son regulados por voltaje como por ejemplo los canales TPK y en cuanto a los Kir-like, aún se desconoce (Figura 1.6) (Lebaudy *et al* 2007; Cuin *et al.*, 2008).

Muchos canales no muestran una estricta rectificación, ya que algunos son capaces de transportar los iones solo en un cierto rango de potencial de membrana y/o en una dirección en particular. Una comparación de las propiedades funcionales de los canales de K<sup>+</sup> tipo Shaker en sistemas de expresión heteróloga con actividad registrada en plantas, indican que estas corrientes son mediadas por canales selectivos a K<sup>+</sup> que son activadas por voltaje que dominan la conductancia de K<sup>+</sup> en la membrana y ambos despolarizan y polarizan el potencial de membrana (Lebaudy *et al.*, 2007).

Basado en esta dependencia de voltaje, estos canales están agrupados entre tres subfamilias funcionales (Lebaudy *et al.*, 2007):

- Canales de rectificación entrante (rectificación entrante), estos canales están involucrados en la toma de K<sup>+</sup> y son activados por una hiperpolarización de la membrama, a partir de un umbral más negativo que el potencial de equilibrio del K<sup>+</sup>.
- Canales de rectificación entrante débil, son capaces de mediar tanto la absorción de K<sup>+</sup> y la su liberación dependiendo del gradiente electroquímico del K<sup>+</sup>.

 Canales de rectificación saliente (rectificación saliente), estos canales se activan a potenciales de membrana más positivos que su gradiente electroquímico, por lo tanto, median la liberación de K<sup>\*</sup>.



**Figura 1.6** Topología y tipos funcionales de canales selectivos a K<sup>+</sup> en plantas. P: poro; CNBD: dominio de unión a nucleótido cíclico; Anky: dominio de unión a anquirina; KHA: región rica en aminoácidos hidrofóbicos; EF: dominio de unión a calcio. Fuente: Lebaudy *et al* (2007).

Para el estudio de los canales se han utilizado bloqueadores como el tetraetilamonio (TEA), el cual es un catión orgánico pequeño y funciona como un bloqueador selectivo de canales de K<sup>+</sup>, ya que impide el paso de K<sup>+</sup> a través del poro de selectividad. El canal de K<sup>+</sup> en estado cerrado requiere de la unión de uno o más iones de K<sup>+</sup> a un sitio dentro del poro para evitar la pérdida de su función y se cree que TEA evita la unión del K<sup>+</sup> a estos sitios (Andalib *et al.*, 2004). De igual manera, para la caracterización funcional de estos canales rectificadores de entrada de K<sup>+</sup> se han empleando sistemas heterólogos (levaduras mutantes, ovocitos de *Xenopus laevis* o células de insecto) así como técnicas

## CAPÍTULO I

electrofisiológicas (patge-clamp, voltage-clamp), las cuales ha permitido comprobar su función y determinar que muestran una elevada permeabilidad a K<sup>+</sup>, una permeabilidad moderada a Rb<sup>+</sup> y baja permeabilidad a Cs<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> (Schachtman *et al.*, 1992).

A nivel molecular el primer sistema de transporte de K<sup>+</sup> que se identifico fueron los canales AKT1 (Sentenac *et al.*, 1992) y KAT1 (Anderson *et al.*, 1992) fueron clonados por complementación funcional de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) *trk1 trk2*, mutantes defectivos en la incorporación de K<sup>+</sup> (Ramos *et al.*, 1994). Posteriormente se clonaron otros genes que codifican canales de K<sup>+</sup> en *A. thaliana.* Respecto a la funciones de estos canales se puede decir que KAT1 Y KAT2 y los canales de K<sup>+</sup> rectificadores de salida GORK participan en la apertura y cierre del poro de los estomas y los canales SKOR que están implicados en la carga de K<sup>+</sup> en el xilema, juegan un rol importante en el transporte K<sup>+</sup> a la parte aérea (Lebaudy *et* al 2007).

#### 1.6.3 TRANSPORTADORES DE POTASIO

El transporte activo de K<sup>+</sup> ha sido asociado a la actividad de transportadores, proponiéndose como probable mecanismo un simporte K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Kochian y Lucas, 1988), dado que las principales bombas primarias en las células vegetales son H<sup>+</sup>-ATPasas. En plantas los genes de los transportadores KUP/HAK/KT se han encontrado en diversos organismos que evolutivamente van desde las algas verdes hasta las angiospermas. La presencia de estos genes en plantas implica su importante participación en la adquisición de nutrientes y en la habilidad a sobrevivir en ambiente pobres en K<sup>+</sup> (Grabov, 2007).

Los genes candidatos para el transporte de K<sup>+</sup> identificados en el genoma de Arabidopsis revelan tres familias de transportadores de KT/HAK/KUP, TRK/HKT y familia antiporte protón catión (CPA).

## 1.6.3.1 TRANSPORTADORES KUP/HAK/KT

Esta familia de transportadores fue identificada en plantas por su homólogo en bacterias KUP (K<sup>+</sup> uptake permeases) y los transportadores de alta afinidad a K<sup>+</sup> en hongos (HAKs).

Cuando el primer miembro de esta familia fue identificado en plantas, genes individuales fueron asignados con diferentes nombres dependiendo de los autores que lo identificaron, estos fueron llamados KT (por transporte de K<sup>+</sup>), HAK o KUP (Gierth y Mäser, 2007). Su caracterización ha sido posible mediante la sobreexpresión en células en suspensión de *Arabidopsis*, mutantes con inserción de T-DNA y por cinética de absorción de Rb<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>), así como su expresión en sistemas heterólogos.

En plantas, estos transportadores están presentes como una familia multigénica; en *Arabidopsis*, se han reportado 13 genes para la familia KT/HAK/KUP, y al menos 27 miembros de esta familia en arroz (Grabov, 2007; Gierth y Mäser, 2007). Estudios de expresión en todos los 13 miembros de la familia KT/HAK/KUP en *Arabidopsis*, revelan que la mayoría de estos genes se expresan en todos los tejidos bajo las condiciones experimentales establecidas. Sin embargo algunos de estos presentaron un rango de expresión limitado (*AtKT/KUP9-12.*) (Andalib *et al.*, 2004).

A nivel de su estructura, los análisis de hidropatía de las secuencias disponibles sugieren la existencia de 12 regiones TM, aunque aún no se ha identificado ningún dominio P (Rodríguez-Navarro, 2000). No obstante, destaca la presencia de una secuencia muy conservada en la 1ª región TM, siendo la secuencia consenso GVVYGDLGTSPLY, habiéndose postulado la implicación de esta región en la formación del presumible dominio P (Rodríguez-Navarro, 2000). También es muy característico el extremo Cterminal, especialmente largo (350 aminoácidos aproximadamente, muchos de ellos polares).

En lo que al funcionamiento de los transportadores se refiere, existen evidencias que sugieren que la incorporación de K<sup>+</sup> se produce en simporte con H<sup>+</sup>. Una de estas evidencias es la capacidad exhibida por el transportador tipo HAK de *Schwanniomyces occidentalis* cuando es expresado en levaduras mutantes *trk1 trk2* de incorporar y prácticamente agotar el K<sup>+</sup> extracelular (Bañuelos *et al.*, 1995). Este transporte se genera en contra del gradiente de concentración (transporte activo secundario) y la energía para que se lleve a cabo proviene del gradiente electroquímico de la membrana generado por las bombas de H<sup>+</sup> que hidrolizan ATP (Alemán, 2009). Otra evidencia no menos importante es que la caracterización funcional del transportador tipo HAK clonado en *N. crassa* (Haro *et al.*, 1999) permite afirmar que la actividad de éste se corresponde con el

simporte K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ya descrito en este hongo (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1986). No obstante, esto no implica que todos los transportadores tipo HAK constituyan mecanismos de alta afinidad. Diversos estudios apuntan, de hecho, a que algunos miembros de esta familia podrían mediar un transporte de K<sup>+</sup> de moderada o baja afinidad (Bañuelos *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2004). En este sentido, es destacable que el análisis filogenético de las secuencias identificadas en cebada, arroz y *Arabidopsis* permite la distinción de cuatro grupos (I – IV; Rubio *et al.*, 2000; Bañuelos *et al.*, 2002), caracterizándose el grupo I por incluir, aparentemente, sólo transportadores de alta afinidad, en contraposición al grupo II, que mayoritariamente engloba transportadores presumiblemente de moderada o baja afinidad.

Otros miembros de la familia muestran distinta afinidad por el K<sup>+</sup> cuando se expresan en levadura. AtKUP1 de *A. thaliana* presenta una afinidad dual, mediando el transporte de K<sup>+</sup> en el rango de baja (LATS) y alta afinidad (HATS) (Fu y Luan, 1998), mientras que el transportador AtKUP2 funciona en el rango de baja afinidad, ya que complementa el fenotipo de una mutante de levadura deficiente en la toma de K<sup>+</sup> cuando la concentración es de 1 mM. (Quintero y Blatt, 1997)

En algunos transportadores de la familia KT/HAK/KUP, se ha demostrado su papel en el desarrollo de la planta. Por ejemplo, una mutación en AtKUP2, causa una reducción en el tamaño de las células de los brotes de *Arabidopsis*, lo que origina el fenotipo *shy3-1* (hipocótilo pequeño en oscuridad, el cual resulta de la reducción de la expansión celular). Sin embargo la mutación no disminuye la capacidad de la proteína de transportar K<sup>+</sup>, cuando se expresa en un sistema heterólogo y la mutante nula *atkup2* no expone el fenotipo. Por lo tanto, el fenotipo *shy* no es causado necesariamente por la reducción en el transporte de K<sup>+</sup> (Grabov, 2007; Rigas *et al.*, 2001). En otra mutante de *Arabidopsis*, que ha perdido por completo su función de generar pelos radiculares normales (*tiny root hair 1 (trh1*)) por la disrupción del gen *AtKUP4/TRH1*. Los pelos radiculares son iniciados en esta mutante pero no logran su elongación y aparecen pequeñas protuberancias en la superficie de las células epidermales. A parte de este defecto, raíces de *trh1* prestan un comportamiento agravitrópico cuando crecen en platos de agar verticalmente. Ninguno de estos defectos morfológicos es *rest*aurado con un incremento en la concentración externa de K<sup>+</sup>. Sin embargo, *TRH1* fue Gapaz de restaurar el transporte de K<sup>+</sup> por *trk1* en

una mutante de *Saccharomyces* deficiente en la toma de K<sup>+</sup> de alta afinidad. Por lo que se cree que TRH1 es requerido para el transporte polar de auxinas en el ápice de la raíz. Aún no es claro como el transporte de K<sup>+</sup>, facilita el transporte de auxinas. *TRH1* podría transportar directamente la auxina o crear un gradiente electroquímico que transporte a la fitohormona a través de la membrana plasmática (Gierth y Mäser, 2007; Grabov ,2007).

En algunos transportadores el mecanismo de toma de alta afinidad a K<sup>+</sup> puede verse inhibido o disminuido en presencia de NH4<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> (Alemán et al., 2009; Szczerba et al., 2008; Martínez-Cordero et al., 2004). Uno de los principales factores que influye en la toma de K<sup>+</sup> del suelo es el nitrógeno inorgánico. El amonio (NH4<sup>+</sup>), reduce la toma de K<sup>+</sup> del ambiente externo y suprime su acumulación en los tejidos de la planta. El mecanismo específico por el cual el NH4<sup>+</sup> inhibe la toma de alta afinidad del K<sup>+</sup> aun no se conoce, sin embargo, se sabe que el NH4<sup>+</sup> inhibe competitivamente la toma de K<sup>+</sup> a nivel de proteína (Szczerba et al., 2008). La sensibilidad del K<sup>+</sup> al influjo de NH4<sup>+</sup> aparentemente depende del mecanismo primario de toma de K<sup>+</sup> dominada por la concentración de K<sup>+</sup> externa (K<sup>+</sup>ext): en presencia de concentraciones micromolares, sistema de transporte de alta afinidad (HATS) y en concentraciones milimolares, sistema de transporte de baja afinidad (LATS). En plántulas de arroz (Oriza sativa L.) tolerantes al NH4<sup>+</sup> se ha comprobado que. niveles bajos de K<sup>+</sup>ext (0.02 y 0.1 mM) inhibe la acumulación de K<sup>+</sup> en los tejidos en presencia de 10 mM de NH4<sup>+</sup> y niveles altos de K<sup>+</sup>ext (1.5 y 40 mM) producen un aumento en la acumulación de K<sup>+</sup> en los tejidos. La inhibición por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> puede ser restaurada por un aumento en la concentración de K<sup>+</sup>ext (Szczerba et al., 2008). Por lo que, la presencia de NH4<sup>+</sup> afecta a los sistemas de transporte de alta afinidad, permitiendo así solo la toma de K<sup>+</sup> a baja afinidad.

Sin embargo, se ha demostrado que canales de K<sup>+</sup> como el AKT1 pueden funcionar como un transporte de alta afinidad en presencia de concentraciones elevadas de  $NH_4^+$ , debido a la presencia de diferentes mecanismos involucrados en la toma de K<sup>+</sup> que pueden ser insensibles o no a  $NH_4^+$ . Por lo tanto, AKT1 juega un papel esencial en la toma de K<sup>+</sup> por la raíz en presencia de  $NH_4^+$  y de una concentración baja de K<sup>+</sup>. Este canal normalmente contribuye a la toma de K<sup>+</sup> mediante un mecanismo de baja afinidad a través de la raíz (Rubio *et al.*, 2004; Lebaudy *et al.*, 2007; Szczerba *et al.*, 2008).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que en presencia de Na<sup>+</sup>, los niveles de

transcrito y la actividad de los transportadores de esta familia disminuyen o se inhiben como en el caso del HAK1 de *Capsicum annuum* (CaHAK1) (Martínez-Cordero *et al.*, 2004) y el HAK5 de *Thellungiella halophila* (Alemán *et al.*, 2009). También existen evidencias que sugieren un influjo de Na<sup>+</sup> de baja afinidad mediado por transportadores de K<sup>+</sup> de alta afinidad (Santa-María *et al.*, 1997).

#### 1.6.3.2 TRANSPORTADORES TRK/HKT

Los transportadores HKT de plantas pertenecen a la superfamilia Trk de transportadores catiónicos que están topológicamente relacionados con los canales de K<sup>+</sup> (Figura 1.7). Ambos están formados por los denominados bloques MPM (dos dominios transmembranales separados por un poro). Concretamente las proteínas HKT/Trk poseen cuatro motivos MPM en un solo polipéptido. Doyle *et al* (1998), estableció que el poro (P-loop") de los canales de K<sup>+</sup> sirve para atraer al catión al entorno hidrofóbico de la membrana plasmática. La hélice del poro termina en el motivo (GYG) glicina-tirosina-glicina que está desprovisto de estructura secundaria y es el encargado de unir el ión K<sup>+</sup>. De hecho, el P-loop" de las proteínas HKT/Trk contiene una glicina altamente conservada. Además se ha demostrado en bacterias que las cuatro glicinas de los cuatro motivos MPM son fundamentales para el transporte de K<sup>+</sup>.

Los genes HKT/Trk se encuentran en bacterias, hongos y plantas, pero han sido selectivamente eliminados del mundo animal (Gierth y Mäser, 2007). En plantas existen dos subfamilias, donde la familia I está implicada en el transporte pasivo de Na<sup>+</sup> de baja afinidad. La subfamilia II catalizan el transporte activo de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> de alta afinidad (Munns y Tester, 2008; Horie *et al.*, 2007; Gierth y Mäser, 2007). Los HKTs, perteneciente a la subfamilia II, poseen los cuatro filtros de glicina (excepto OsHKT1 en arroz, respectivamente OsHKT2, 1; nueva nomenclatura). La glicina en el primer p-loop es necesaria para el transporte de K<sup>+</sup> en OsHKT2 y TaHKT1 en trigo (Gierth y Mäser, 2007). En arroz se han identificado nueve genes que codifican para transportadores HKT (*Os*HKT1-9). La expresión de *TaHKT1* en trigo al igual que *OsHKT2* en arroz, es inducida en el tejido de la raíz a bajas concentraciones de K<sup>+</sup> y ambas proteínas funcionan como un simporte de K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> cuando es expresado en ovocito de *Xenopus* o *Saccharomyces* 

*cerevisiae*, sugiriendo que el cotransporte de Na<sup>+</sup> facilita la toma de K<sup>+</sup> por la raíz (Gierth y Mäser, 2007).

Las proteínas HKT de plantas, en un principio fueron estudiadas en relación con el transporte de K<sup>+</sup>. Actualmente se sabe que todos los transportadores HKT de plantas son permeables a Na<sup>+</sup>, y que algunos de ellos también lo son a K<sup>+</sup>. Debido a esto, la investigación en relación a estos transportadores se ha centrado en su implicación en la adaptación a ambientes salinos más que en un posible papel en la nutrición de K<sup>+</sup> (Haro *et al.*, 2005; Haro *et al.*, 2010).

El primer gen HKT/Trk de plantas que se identifico fue *TaHKT1* de trigo, y fue el primer transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad descrito en plantas, cuyo mecanismo corresponde a un cotransportador acoplado al gradiente de sodio (Na<sup>+</sup>), pero es capaz de transportar K<sup>+</sup> cuando era expresado en ovocitos de *Xenopus laveis*. Sin embargo, el ortólogo de *Arabidospsis* AtHKT1 sólo transporta Na<sup>+</sup> en levaduras y en ovocitos. En eucalipto, los genes *EcHKT1* y *EcHKT2*, al ser expresados en ovocitos median la entrada de Na<sup>+</sup> junto con el transporte de K<sup>+</sup> y estos transportadores son capaces de restaurar la toma de K<sup>+</sup> en *E. coli* deficientes (Gierth y Mäser, 2007).

Se ha de mostrado que en mutantes de HKT1 de *Arabidopsis* tienen menores niveles de Na<sup>+</sup> en la raíz pero, mayores en la parte aérea. Por lo que las mutante *athkt1* son resistentes a salinidad a corto plazo, pero hipersensibles a un largo plazo (Mäser *et al.*, 2002; Gierthy Mäser, 2007). Además AtHKT1 ha sido propuesto como mediador en la recirculación de Na<sup>+</sup> desde la parte aérea hacia la raíz. Se sabe por estudios de inmunolocalización, que HKT1 descarga Na<sup>+</sup> desde los vasos del xilema hasta las células del parénquima xilemático, allí el Na<sup>+</sup> difundiría al floema mediante plasmodesmos y recircularía nuevamente a la raíz. Esto concuerdan con el hecho de que la savia del xilema en plantas mutantes *athkt1* tiene mayor contenido en Na<sup>+</sup> que los controles silvestres (Berthomieu *et al.*, 2003; Gierth y Mäser, 2007).

En un estudio más reciente Moller et al (2009), demostraron que la sobreexpresión de HKT1;1 en las células de la estela de raíces maduras de *Arabidopsis*, mediante el uso del sistema de expresión *enhancer trap*, provoca una reducción de la transferencia de Na<sup>+</sup> de la raíz a la parte aérea. Esta reducción del contenido de Na<sup>+</sup> en la parte aérea tiene como

consecuencia un incremento de la tolerancia a la salinidad. Por el contrario, observaron que plantas que expresaban constitutivamente HKT1;1 bajo el control del promotor 35S, presentaban un alto contenido de Na<sup>+</sup> en la parte aérea y eran sensibles al Na<sup>+</sup>.

En arroz se han identificado nueve transportadores tipo HKT y se ha comprobado que el transportador OsHKT2;1 cataliza la absorción activa de Na<sup>+</sup> en raíz con alta afinidad en condiciones de carencia de K<sup>+</sup>, demostrando que en estas condiciones el Na<sup>+</sup> puede reemplazar parcialmente al K<sup>+</sup> (Garciadeblas *et al.*, 2003; Horie *et al.*,2007). Altas concentraciones de K<sup>+</sup> inhiben el transportador (Garciadeblas *et al.*, 2003), mientras que a altas concentraciones de Na<sup>+</sup>, la expresión del transportador se reduce fuertemente para evitar niveles tóxicos de Na<sup>+</sup> en la planta. Se ha comprobado que este transportador es permeables a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup> y que presenta distintos modos de transporte en función de las concentraciones externas de K<sup>+</sup> y/o Na<sup>+</sup>: uniporte a Na<sup>+</sup>, cuando la concentración externa de Na<sup>+</sup> esta en rango milimolar y la del K<sup>+</sup> en el rango micromolar.; simporte Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, a concentraciones externas de Na<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> (Hori *et al.*, 2007).

## 1.6.3.3 TRANSPORTADORES ANTIPORTE PROTÓN/CATIÓN (CPA)

Los antiportadores catión monovalente/protón se engloban en dos familias CPA1 y CPA2, además se encuentran en plantas, hongos, bacterias y animales (Gierth y Mäser, 2007). Tanto CPA1 como CPA2 se subdividen en otros grupos que pueden ser específicos de algún reino en particular. Por ejemplo la familia NhaP corresponde a bacterias, NHE-PM a animales y SOS1 a plantas. Los CPAs trabajan sin que les afecte el diferencial de potencial de membrana (son electroneutros) y su función puede ser tanto la de regular la homeostasis de los cationes monovalentes como la de regular el pH (Brett *et al.*, 2005; Gierth y Mäser, 2007).

En mutantes *atnhx1* de *Arabidopsis* se observan bajas concentraciones de K<sup>+</sup> en las partes aéreas. En estudios con liposomas se comprueba que AtNHX1 transporta Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> con la misma afinidad (K<sub>m</sub> de 42  $\mu$ M K<sup>+</sup> y 45  $\mu$ M para Na<sup>+</sup>). También esta capacidad dual K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> es observada para las proteínas vacuolares CPA1 como son ItNHX1 y

OsNHX1. La función propuesta para estas CPAs de tonoplasto es la de usar el gradiente de pH para cargar indiscriminadamente  $K^*$  y Na<sup>+</sup> en la vacuola con la finalidad de almacenar (en el caso del  $K^*$ ), destoxificar (Na<sup>+</sup>), y generar turgencia (Venema *et al* 2002; Gierth y Mäser, 2007).

En *Arabidopsis*, sólo han sido analizadas dos proteínas, AtCHX17 y AtCHX23. AtCHX17 se expresa en raíces a altas concentraciones de sal, bajo pH externo y tratamiento con ABA. Las mutantes *atchx17* acumulan menos K<sup>+</sup> que los controles y AtCHX17 co-localiza con marcadores de Golgi y complementa a la mutante sensible a pH de levadura *kha1*. Estos estudios indican su papel fundamental en la homeostasis de K<sup>+</sup> y en la regulación de pH. AtCHX23, se encuentra en las membrana cloroplásticas y en las mutantes con pérdida de función muestran una estructura cloroplástica alterada con una fuerte reducción de clorofila en hojas de plántulas y un elevado pH citosólico en las células guarda (Gierth y Mäser, 2007).

El K<sup>+</sup> es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las platas. Por ello, las plantas deben disponer de mecanismos de señalización que les permitan ajustar rápidamente los sistemas de absorción de este catión a la variable disponibilidad del mismo en el medio. Se ha demostrado que las variaciones de la concentración de K<sup>+</sup> externa afectan directamente a la actividad de canales y transportadores de K<sup>+</sup> y, además provocan la alternancia entre los dos mecanismos de toma de K<sup>+</sup>. Cuando las células vegetales detectan una deficiencia de K<sup>+</sup> en el medio externo, generan señales citoplasmáticas de Ca<sup>2+</sup> que son detectadas por sensores de Ca<sup>2+</sup>. Esta señal de Ca<sup>2+</sup> es transmitida a proteínas blancos (transportadores de K<sup>+</sup> y canales), que son reguladas a nivel transcripcional o post-transcripcional. Como resultado se mantiene la homeostasis de K<sup>+</sup> y las plantas pueden adaptarse a un ambiente con bajo K<sup>+</sup> (Wang y Wun, 2010).

La transcripción de los transportadores de K<sup>+</sup> de *Arabidopsis*, AtHAK5, AtKEA5, AtKUP3, *AtCHX13 y AtCHX17*, es inducida por ayuno de K<sup>+</sup> (Kim *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2004; Cellier *et al.*, 2004; Shin y Schachtman, 2004; Gierth *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2008). Se ha comprobado que AtHAK5, AtCHX13 y AtCHX17 están implicados en la adquisición y homeostasis de K<sup>+</sup> en plantas en condiciones de deficiencia de K<sup>+</sup> (Cellier *et al.*, 2004; Gierth *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004;

Shin y Schachtman (2004) observaron que la deficiencia de K<sup>+</sup> produce una liberación de  $H_2O_2$  que induce la expresión de genes que codifican transportadores de K<sup>+</sup> como AtHAK5. En otras especies también se ha demostrado la existencia de transportadores cuya transcripción es inducida por ayuno de K<sup>+</sup>, como el LeHAK5 de tomate, HvHAK1 de cebada, CaHAK1 de pimiento y OsHAK1 de arroz (Santa-María *et al.*, 1997; Bañuelos *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Martínez-Cordero *et al.*, 2005; Leidi *et al.*, 2010).

La regulación de las actividades de canales y transportadores de K<sup>+</sup> mediante modificaciones post-traduccionales juega un papel crucial en la transducción de la señal en respuesta a deficiencia de K<sup>+</sup>. Existen evidencias de que la fosforilación y desfosforilación de canales de K<sup>+</sup>, mediada por proteínas quinasas y fosfatasas, respectivamente, constituyen un mecanismo importante en las respuestas de la planta a la deficiencia de K<sup>+</sup> (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006). AKT1, puede funcionar en el rango de alta y baja afinidad. Se ha sugerido que el cambio entre ambos mecanismos de toma de K<sup>+</sup> puede ser controlados por el estado de fosforilación de AKT1 (Li *et al.*, 2006).



I SUTTERA DE EXTREMON METEROLOGIA FILME EL ENTREMO D

**Figura 1.7** Posibles transportadores y canales de K<sup>+</sup> en células de la raíz de plantas. CNGC: canales de unión a nucleótido cíclico; LCT1: Transporte de cationes de baja afinidad; TPK: Canales de K<sup>+</sup> con poro en tándem; CCC: Co-transporte catión/cloro; SKOR: Rectificación saliente de K<sup>+</sup> del tejido estelar; HKT: Transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad; KORC: Canales de rectificación saliente de K<sup>+</sup>; CPA: Antiporte catión/H<sup>+</sup>; HAK/KUP/KT: Familia simporte de alta afinidad a K<sup>+</sup>; KIRC: Canales de rectificación entrante de K<sup>+</sup>; CHX: Intercambio catión/H<sup>+</sup>; PmitoKATP: Canales de K<sup>+</sup> de mitocondria de plantas sensibles a ATP; NHX: Intercambio Na+/H+; FV: Canales de vacuola de activación rápida; TPC: Canales de dos poros; SV: Canales de vacuola de activación lenta; VK: Canales vacuolares de K<sup>+</sup>. Szczerba *et al.* (2009).

# 1.7 SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA PARA EL ESTUDIO DE CANALES Y TRANSPORTADORES

Los sistemas celulares de expresión de genes heterólogos son sistemas procariotas o eucariotas, con sus ventajas e inconvenientes. Para seleccionar un sistema óptimo de expresión hay que tener en cuenta por un lado la productividad, bioactividad, y características fisicoquímicas de la proteína de interés; por otro, el costo, y la bioseguridad del sistema (Dreyer *et al.*, 1999).

Los sistemas de expresión se pueden clasificar en dos grandes categorías: procariotas y eucariotas. Los sistemas de expresión procariotas son generalmente mucho más fáciles para trabajar y son útiles en la mayoría de las aplicaciones; sin embargo, tienen importantes limitaciones para expresar proteínas eucariotas completamente funcionales. Esto es debido a que no realizan sobre las proteínas la mayoría de las modificaciones postraduccionales que realizan las células eucariotas y que permiten a las proteínas plegarse de forma correcta para ser plenamente funcionales. Los sistemas de expresión éptima mediante los sistemas de expresión procariotas. El uso del sistema de expresión adecuado requiere evaluar desde el rendimiento, a las modificaciones necesarias para una proteína funcional, a consideraciones económicas si se considera un escalado en la producción de la proteína (Cultek, 2009).

La expresión de genes en sistemas heterólogos ha permitido el aislamiento de nuevos genes (por ejemplo, para la absorción de nutrientes y el transporte) y ha contribuido en el análisis funcional de los mismos. Numerosos sistemas de expresión heteróloga se han utilizado para la identificación y caracterización de proteínas transportadoras de membrana en plantas (Dreyer *et al.*, 1999). A continuación se describen algunos de ellos.

#### 1.7.1 Escherichia coli

Uno de los sistemas heterólogos más utilizado para la expresión de proteínas es *E. coli*, debido a su alta tasa de crecimiento, capacidad para el cultivo continuo y bajo costo. Sin embargo, su principal limitación para la expresión de proteínas heterólogas es su

imposibilidad de realizar modificaciones postranscripcionales y la ausencia de las chaperonas apropiadas para el plegamiento de algunas proteínas (Cole, 1996). Estas modificaciones son necesarias para la correcta conformación de la estructura terciarias de las proteínas. Afectan por tanto a su estructura, solubilidad, estabilidad, vida media, resistencia a proteinasas, compartamentalización y finalmente a su actividad biológica (Nelson y Cox, 2004). Para evitarlo en ocasiones se sobreexpresan diferentes chaperonas junto con la proteína de interés (Cole, 1996).

A pesar de que *E. coli* es un sistema bien establecido para la producción de proteínas, la expresión heteróloga de proteínas de membrana ha sido poco exitosa, e incluso la proteína no siempre es obtenida de una forma funcional. El principal problema podría ser el fallo de la proteína expresada correctamente. Probablemente por estas limitaciones, *E. coli* no se ha convertido en un sistema eficiente de expresión para los transportadores de membrana en plantas (Kühlbrand y Wang, 1991). Sin embargo, *E. coli* es a veces utilizada para producir proteínas de transporte en plantas y recientemente para mediciones del flujo directo y ensayos de complementación (Kin *et al.*, 1998; Dreyer *et al.*, 1999). Ahn (2004) estudio el transporte de K<sup>+</sup> de siete genes que codifican para los transportadores AtKUP (AtKT3/KUP4, AtKT/KUP5, AtKT/KUP6, AtKT/KUP7, AtKT/KUP10, AtKT/KUP11 y AtHAK5). Para ello, utilizó la cepa de *E. coli* TK2420 deficiente en tres sistemas de toma de K<sup>+</sup> (Kdp, Kup y Trk) y mediante un estudio de complementación determinó que cinco genes AtKT/KUPs (AtKT/KUP5-7 y 10 y 11) son capaces de restaurar el crecimiento y complementar la toma de K<sup>+</sup> en la mutante de *E. coli*, comprobando que estas proteínas participan en el transporte de este catión.

#### 1.7.2 Ovocitos de Xenopus

Los ovocitos recuperados del sapo Xenopus laevis, han sido utilizadas como una poderosa herramienta para el estudio de expresión heteróloga de genes por más de 25 años mediante el uso de técnicas electrofisiológicas (Dreyer *et al.*, 1999; Gurdon *et al.*, 1971). Los ovocitos de Xenopus son bastantes robustos y son fáciles de manejar por su gran tamaño (1mm de diámetro), y por el otro lado pueden sintetizar y reunir una variedad de proteínas después de la inyección de ADN o ARN aislado de varios tejidos o

sintetizado in vitro a partir de clonas de ADN complementario. El tamaño y la facilidad del manejo han hecho que los ovocitos sean adecuados para la medición de agua y flujo de solutos, y en particular, la caracterización electrofisiológica de transportadores electrogénicos de membrana (Dreyer *et al.*, 1999). En arroz (*Oryza sativa*), se han caracterizado dos canales HKT, OsHKT2;1 y OsHKT2;2 mediante su expresión en ovocitos de *Xenophus*. Estudios de voltage clamp utilizando los ovocitos transformados mostraron las diferencias de selectividad Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> que existen para ambos canales (Yao *et al.*, 2010).

## 1.7.3 CÉLULAS DE INSECTO

Otra alternativa de sistemas de expresión, es la infección en células de insecto por medio de baculovirus recombinante. Los baculovirus son conocidos por su alta eficiencia como vectores de expresión génica heteróloga en células eucariotas (Dreyer *et al.*, 1999). Los vectores de expresión de baculovirus se caracterizan por su capacidad de producir inmensas cantidades de proteínas heterólogas funcionales. Una de las características de los sistemas de expresión baculovirus/insecto que más han llamado la atención es su capacidad de procesar proteínas eucariotas (Dreyer *et al.*, 1999). Un prerrequisito para el sistema insecto/baculovirus es la preparación de baculovirus recombinantes (rBV) mediante la inserción de un gen extraño en un vector de transferencia basado en un plásmido, que entonces se incorpora al genoma del baculovirus (BV) mediante una recombinación homóloga (Huynh y Zieler, 1999). Baculovirus infecta a las células de la polilla *Spodoptera frugiperda* (líneas celulares *Sf*9 y *Sf*21) han sido utilizadas para la caracterización bioquímica y fisiológica de canales de K<sup>+</sup> de plantas (Gaymard *et al.*, 1996; Dreyer *et al.*, 1999).

La utilización de los baculovirus como sistema de expresión se basa en la sustitución de los genes de la fase muy tardía, principalmente *polh* y *p10*, por los genes de interés. Estos genes (gen *polh* que codifica para la proteína mayoritaria de la matriz cristalina, la poliedrina, y el gen *p10*) de expresión muy tardía se caracterizan por tener elevadísimos niveles de expresión y por ser prescindibles en el ciclo replicativo del baculovirus y que dan lugar a la formación de la matriz cristalina que embeberá a los viriones acabando en

la producción de la forma poliédrica del virus. De este modo, no se pone en peligro la replicación del virus y se obtienen enormes cantidades de la proteína de interés en el medio de cultivo. Sin embargo, este sistema tiene algunas deficiencias. Por ejemplo, el gen heterólogo no se puede expresar continuamente ya que las células infectadas mueren. Cada ronda de síntesis de la proteína de interés requiere la infección de nuevas células de insecto (Kost y Condreay, 1999).

#### **1.7.4 LEVADURAS**

Muchas de las bases del conocimiento sobre los transportadores de membranas en plantas ha sido obtenido por el empleo de levaduras como Saccharomyces cerevisae y Schizosaccharomyces pombe para su estudio. Estos organismos tienen un periodo de generación corto y son de fácil manipulación y como eucariotas unicelulares, las levaduras pueden producir proteínas recombinantes, correctamente plegadas y solubles que han sufrido todas las modificaciones postraduccionales esenciales para ser funcionales; el sistema de endomembranas que posee permite que algunas proteínas sintetizadas intracelularmente sean secretadas al espacio extracelular (Daly y Hearn, 2005). El gran progreso en el uso de levaduras como un sistema de expresión heterólogo para transportadores de plantas ha sido facilitado por la ingeniería de cepas de levadura con deficiencias específicas en las rutas de transporte (Dreyer et al., 1999; Riesmeier et al., 1992). Por medio de la complementación funcional, tales cepas son utilizadas para proveer la funcionalidad del transportador clonado y para la identificación de nuevos transportadores mediante librerías de ADN complementario. En adición a esto, las levaduras son adecuadas para realizar mediciones del flujo y permitir la determinación del sustrato más a fin para un transportador en particular (Dreyer et al., 1999).

#### 1.7.4.1 Saccharomyces cerevisae

La levadura Saccharomyces cerevisiae constituye un sistema conveniente para la expresión heteróloga de genes eucariotas, ya que es un organismo no patógeno que se multiplica rápidamente, está bien caracterizada genéticamente y es un sistema eucariota

en el que están presentes los mecanismos postraduccionales de modificación de proteínas. Por otra parte, la existencia de mutantes desprovistos de sus sistemas de transporte propio, convierte a las células de levadura en una herramienta ideal para el estudio del transporte y homeostasis de cationes así como para el estudio molecular de transportadores de eucariotas superiores (Darley *et al.*, 2000; Haro *et al.*, 1993). En este sentido, la identificación de los primeros canales de K<sup>+</sup> de *Arabidopsis*, se llevó a cabo mediante complementación heteróloga de una cepa de levadura mutante (trk1 $\Delta$ trk2 $\Delta$ ) capaz de crecer a bajas concentraciones de K<sup>+</sup> (Anderson *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992)

En *S. cerevisiae* se han clonado dos genes implicados en la entrada de K<sup>+</sup>, que codifican para dos proteínas de membrana, de 1241 y 849 aminoácidos, respectivamente. Ambas se caracterizan por presentar 12 dominios transmembranales (Ko y Gaber, 1991). El gen TRK1, codifica para un transportador que presenta una alta afinidad para el K<sup>+</sup> (Gaber *et al.*, 1988). El gen TRK2, codifica para una proteína muy similar a *Trk1p* (55% identidad) que muestra una moderada afinidad para el K<sup>+</sup> y una baja actividad en condiciones normales (Ko y Gaber, 1991) (Figura 1.8). La ausencia de TrK1p da lugar a una levadura incapaz de crecer a concentraciones micromolares de K<sup>+</sup> (Ramos *et al.*, 1985) y a la aparición de un sistema de muy baja afinidad. En las células *trk1*, la disrupción del gen TRK2 incrementa los requerimientos de K<sup>+</sup> y su sobreexpresión restaura la capacidad de crecimiento en el rango micromolar de la cepa silvestre (Ramos *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1990).

Para explicar la organización molecular y funcional del transporte de K<sup>+</sup> en *S. cerevisiae* se han formulado dos hipótesis. Una propone la existencia de dos sistemas independientes de transporte: uno, de alta afinidad, TRK1, y otro, de baja afinidad, TRK2; ya que la interrupción simultanea de ambos genes (doble mutante *trk1* + *trk2*) no afecta la variabilidad celular en medios con abundante K<sup>+</sup>, este modelo propone que otros transportadores de membrana participan en la entrada de K<sup>+</sup> (Gaber, 1992). Un segundo modelo propone que el transporte para este catión en esta cepa mutante *trk1 trk2* puede ser debida a la existencia de un transportador específico de K<sup>+</sup> que forma parte de un único sistema transportador, formado éste por varias subunidades (Ramos *et al.*, 1994).

La primera hipótesis está basada en estudios realizados en mutantes obtenidos a partir de células *trk1 trk2* que suprimen el defecto de crecimiento a bajo K<sup>+</sup> y de sensibilidad a pH ácido. Se ha descrito que mutaciones en los transportadores de glucosa, de galactosa o de aminoácidos restauran el crecimiento abajo K<sup>+</sup>. La segunda ha sido propuesta con el fin de explicar porqué el transporte de baja afinidad de K<sup>+</sup> no aparece en cepas tipo silvestre y porqué la glucosa activa la entrada de baja afinidad de Rb<sup>+</sup> en mutantes *trk1* de la misma forma que la alta afinidad de la cepa tipo silvestre (Alijo y Ramos, 1993; Ramos *et al*, 1994). La complementación de mutantes en levadura ha sido usada con éxito para identificar genes de plantas que desempeñan funciones similares. Así, los canales AKT1 (Sentenac *et al.*, 1992) y KAT1 (Anderson *et al.*, 1992) fueron clonados mediante complementación funcional en levaduras *trk1 trk2* (*S. cerevisiae*), mutantes defectivos en la incorporación de K<sup>+</sup>. Años después de que se clonaran los primeros canales de K<sup>+</sup>, se clonó el primer transportador de K<sup>+</sup>, HKT1 de trigo (*T. aestivum*) (Schachtman y Schroeder, 1994), de nuevo por complementación funcional de levaduras *trk1 trk2*.



**Figura 1.8** Mutantes de *S. cerevisiae* y *E. coli* deficientes en los sistemas de transporte de K<sup>+</sup>. Uozomi (2001).

#### CAPÍTULO I

De lo anteriormente expuesto, se concluye que el K<sup>+</sup> es un macronutriente absorbido por las plantas en grandes cantidades siendo superado sólo por el N y, a veces por el Ca<sup>2+</sup>. Su importancia en las plantas radica en las numerosas funciones en las que participa tales como: la síntesis de proteínas (Wakeel *et al*, 2011), activación de enzimas (Nitsos y Evans, 1969; Mathuis, 2009); ajuste osmótico (Marschner, 1986; Pandey et al., 2007); entre otras. También, se ha visto que influye en la tolerancia al frío, en la resistencia a la sequía y mejora la calidad de las cosechas de granos y frutos; además podría estar relacionado en la resistencia de las plantas a ciertas enfermedades. Debido a la importancia que tiene el K<sup>+</sup> y a que en los suelos su disposición es limitada, en la agricultura es adicionado a los cultivos mediante fertilizantes.

Los suelos del estado de Yucatán tienen pocas posibilidades de uso agrícola, debido a sus terrenos carbonatados y la presencia de los afloramientos. Asimismo, la concentración de K<sup>+</sup> que se encuentra disponible para ser absorbido por la planta es escaza. A pesar de ello el chile habanero (*C. chinense* Jacq.) se desarrolla en estos tipos de suelos; esto podría deberse a la capacidad del cultivo de absorber cantidades mínimas de K<sup>+</sup> (concentración  $\mu$ M). En la toma de K<sup>+</sup> en un rango  $\mu$ M está involucrado el transporte de alta afinidad mediado por proteínas transportadoras pertenecientes a la familia KUP/HAK/KT (Grabov, 2007; Gierth y Mäser, 2007; Aleman *et al.*, 2009), lo que confiere la habilidad a ciertos cultivos de desarrollarse en ambientes pobres de K<sup>+</sup>. Por lo que, mediante el empleo de herramientas moleculares y la expresión heróloga se clonó y caracterizó un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad de raíces de chile habanero (*C. chinense* Jacq.).
#### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar funcionalmente un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad de chile habanero (C. chinense Jacq.)

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Obtención del ADNc de un transportador de  $K^{+}$  de alta afinidad de chile habanero (C. chinense Jacq.)

Expresión del ADNc del transportador en un sistema heterólogo.

Caracterización funcional del ADNc del transportador mediante estudios de complementación y análisis cinéticos.

## JUSTIFICACIÓN

El K<sup>+</sup> junto con el N y P es uno de los tres elementos más importantes para el desarrollo normal de las plantas. A pesar de que en la mayoría de los suelos del estado de Yucatán los niveles de K<sup>+</sup> son relativamente altos, en ocasiones este mineral debe de ser adicionado a los cultivos, esto debido a que gran parte del K<sup>+</sup> no se encuentra disponible y no puede ser absorbido por las plantas y a que una parte del K<sup>+</sup> disponible en la solución del suelo se pierde por lixiviación. A pesar de ello, el chile habanero (*C. chínense* Jacq.) es capaz de crecer bajo estas condiciones en estos suelos; por lo tanto, debe de contar con un sistema eficiente de toma de K<sup>+</sup> que le permita absorberlo en concentraciones micromolares a partir de la solución del suelo. La caracterización de éste transporte podría contribuir a reducir la cantidad de fertilizantes potásicos empleados en ocasiones para su cultivo reduciendo así los costos de producción.

#### ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para la obtención del ADNc del transportador de K<sup>+</sup> (Figura1.9) se utilizaron raíces de plántulas de chile habanero en condiciones de ausencia de K<sup>+</sup> durante cinco días, a partir de las cuales se realizó la extracción del ARN y síntesis de ADNc del cual se obtendrá el ADNc total mediante la amplificación de los extremos 5'y 3'mediante el método de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). El ADNc total se expresará en un sistema heterólogo para caracterizarlo funcionalmente mediante estudios de complementación y cinéticas de transporte.



**Figura 1.9** Estrategia experimental para la obtención y caracterización de CcHAK1, un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad de raíz de chile habanero (*C. chinense* Jacq.).

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahn S.J., Shin R., Schachtman D.P. (2004). Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K<sup>+</sup> uptake. Plant Physiology, 134:1135-1145.
- Aidley D. J.; P. R. Stanfield. (2003). Ion channel: Molecules in action. Charper 2: Ions on the move, pp 17-19, Cambridge University Press.
- Alemán G.F. (2009). Absorción de K<sup>+</sup> en plantas con diferente tolerancia a la salinidad. Tesis de Doctorado. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Murcia: CEBAS-CSIC. pp 22-23.
- Alijo R. y J. Ramos. (1993). Several routes of activation of the potassium uptake system of yeast. Biochim Biophys Acta 1179: 224-228.
- Anderson J.A.; S. S. Huprikar; L. V. Kochian; W. J. Lucas; R. F. Gaber. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Aca. Sci. USA 89:3736-3740.
- Andalib P.; J. F. Consiglio; J. G. Trapani; S. J. Korn. (2004). The external TEA binding site and C-tipe inactivation in voltaje-gated potassium channels. Biophysical Journal 87:3148-3161.
- Angeli A.; S. Thomine; J. M. Frachisse; G. Ephritikhine; F. Gambale; H. Barbier-Brygoo. (2007). Anion channels and transporters in plant cell membranes. FEBS Letters 581:2367-2374.
- Arnon D. I. y P. R. Stout. (1939). The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. Plant Physiology 14:371-375.
- Ashley M. K.; M. Grant; A. Grabov. (2006). Plant responses to potassium deficiencies: a rol for potassium transport proteins. Journal of Experimental Botany 57(2):425-436.
- Ayala V. H. D. (2002). Le lk: Los chiles en Guatemala. Journal of Experimental Botany 54(388):1655-1664.

- Bañuelos M. A.; B. Garciadeblas; B. Cubero; A. Rodríguez-Navarro. (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. Plant Physiology 130:784-795.
- Bañuelos M. A.; R. D. Klein; S. J. Alexander-Bowman; A. Rodríguez-Navarro. (1995). A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. EMBO J., 14:3021-3027.
- Bañuelos M.A.; B. Garciadeblas; B. Cubero; A. Rodríguez-Navarro. (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. Plant Physiol., 130: 784-795.
- Barber, S.A. (1984). Soil nutrient bioavailability. John Wiley. New York. En Borges-Gómez
  L.; A. Escamilla-Bencomo1; M. Soria-Fregoso; V. Casanova Villareal. (2005).
  Potasio en suelos de Yucatán. Terra Latinoamericana 23: 437-445.
- Berthomieu, P., G. Conejero; A. Nublat; W.J. Brackenbury; C. Lambert; C. Savio; N. Uozumi; S. Oiki; K. Yamada. F. Cellier; F. Gosti; T.Simonneau; P.A. Essah; M. Tester; A.A. Very; et al. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na+ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. EMBO Journal 22:2004-2014.
- Bidwell R. G. S. (1993). Fisiología Vegetal. Capitulo 10: Nutrición mineral. pp. 265-275. 1° edición. México.
- Bortner et al. (2003). Journal Biolochical Chemestry 276(6):4304-4314.
- Bortner C. D.; J. A. Cidlowski. (2003). Uncoupling Cell Shrinkage from Apoptosis Reveals That Na<sup>+</sup> Influx Is Required for Volume Loss during Programmed Cell Death.
- Brett, C. L.; M. Donowitz; R. Rao. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. American Journal of Physiology Cell Physiology 288:223-239.
- Britto T. D.; H. J. Kronzucker. (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. Physiologia Plantarum 1-14.

- Borges-Gómez L.; A. Escamilla-Bencomo; M. Soria-Fregoso; V. Casanova Villareal. (2005). Potasio en suelos de Yucatán. Terra Latinoamericana 23: 437-445.
- Borges-Gómez L.; A. Escamilla-Bencomo1; M. Soria-Fregoso; V. Casanova Villareal. (2008). Potasio en suelos de Yucatán. *TERRA Latinoamericana* 23(4): 437-445 Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Cakmak I.; C. Hengeler; H. Marschner. (1994). Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. Journal of Experimental Botany 45: 1251-1257.
- Cellier F.; G. Conejero; L. Ricaud; D. T. Luu; M. Lepetit; F. Gosti; F. Casse. (2004). Characterization of AtCHX17, a member or the cation/H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. Plant Journal 39:834-849.
- Chrispeels M. J.; N. M. Crawford; J. I. Schroeder. (1999). Protein for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. Plant Cell 11:661-676.
- Cole P. A. (1996). Chaperone-assisted protein expression. Structure 4:239-242. In Cultek. Aplicaciones: Sistema de expresión de proteínas: Sistemas de Expresión para la producción de proteínas heterólogas. [en línea]. Junio 2012. Disponible en la Web: http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\_Genica&opc= tecni cas#13.
- Comerford N. (1999). Mecanismos de captación de nutrimentos en ecosistemas forestales: de cómo interpretar la fertilidad en el contexto de la conservación de recursos genéticos. *En*: Orellana, R., Escamilla, A., Larqué, A. (eds). Ecofisiología vegetal y conservación de recursos genéticos. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. México. pp. 127-135.
- Cuin T. A.; A. J. Miller; S. A. Laurie; R. A. Leigh. (2003). Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. Journal of Experimental Botany, 54(383):657:661.

Cuin T. A; Pottosin I. I.; S. N. Shabala. (2008). Plant Membrane and Vacuolar

Transporters, chapter 1: Mechanisms of potassium uptake and transport in higher plants. Edited by P. Jaiwal; R. Singh; O. P. Dhankher.

- Cuin T. A.; S. Shabala. (2006). Potassium homeostasis in salinised plant tissues. In A Volkov, ed, Plant Electrophysiology-Theory and Methods. Springer, Heidelberg, 287–317.
- Czempinski K.; S. Zimmermann; T. Ehrhardt; B. Müller-Röber. (1997). New structure and function in plant K<sup>+</sup> channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca<sup>2+</sup> dependency. EMBO Journal 16:2565-2575.
- Daram P.; S. Urbach; F. Gaymard; H. Sentenac; I. Chérel. (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. EMBO Journal 16:3455-3463.
- Daly R.; M. T. W. Hearn. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. Journal Molecular Recognition 18:119-138. *In* Cultek. Aplicaciones: Sistema de expresión de proteínas: Sistemas de Expresión para la producción de proteínas heterólogas. [en línea]. Junio 2012. Disponible en la Web: http://www.cultek.com/aplicaciones.asp? p=Aplicacion\_Genica&opc=tecnicas#13.
- Darley C. P.; O. C. van Wuytswinkel; K. van der Woude; W. H. Mager; A. H. de Boer. (2000). Arabidopsis thaliana and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. Biochemistry Journal 351:241-249.
- De Boer A. H.; V. Volkov. (2003). Logistics of water and salt transport throught the plant: structure and functioning of the xylem. Plant Cell and Environment 26:87-101.
- Doman D.C.; D. R. Geiger. (1979). Effect of exogenously supplied foliar potassium on phloem loading in *Beta vulgaris* L. Plant Physiology 64:528-533.
- Doyle D.A.; J. Cabral; R.A. Pfuetzner; A. Kuo; J.M. Gulbis; S.L. Cohen; B.T. Chait; R. MacKinnon. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. Science 280:69-77.

- Dreyer I.; C. Horeau; G. Lemaillet; S. Zimmermann; D. R. Bush; A. Rodríguez-Navarro; D. P. Schachtman; E. P. Spalding; H. Sentenac; R. F. Gaber. (1999). Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. Journal Experimental Botany 50:1073-1087.
- Duch G.J. (1988). La conformación territorial del estado de Yucatán. Universidad Autónoma Chapingo-Centro Regional de la Península de Yucatán. Texcoco, México.
- Ehrhardt T.; S. Zimmermann; B. Müller-Röber. (1997). Association of plant K<sup>+</sup> in channels is mediated by conserved C termini and does not affect subunit assembly. FEBS Letters 409:166-170.
- Epstein E. (1973). Mechanisms of ion transport through plant cell membranes. Int. Rev. Cytol., 34:123-168.
- Epstein E.; A. J. Bloom. (2005). Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. Second ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Fadeel E.; B. Orrenius. (2005). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in human disease. Journal Internal Medicine 258(6):479:513.
- Fu H. H.; S. Luan. (1998). AtKUP1: A dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from Arabidopsis. Plant Cell 10:63:73.
- Gaber R. F.; C. A. Styles; G. R. Fink. (1988). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transporter HKT1. Plant Journal 10:869:882.
- Gaber R. F. (1992). Molecular genetics of yeast in transport. Int. Rev. Cytol. 137A:299-353.
- Garciadeblas B.; M. E. Senn; M. A. Bañuelos; A. Rodriguez-Navarro. (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. Plant Journal 34: 788-801.
- Gaymard F.; M. Cerutti; C. Horeau; G. Lemaillet; S. Urbach; M. Ravallec; G. Devauchelle; H. Sentenac; J. B. Thibaud. (1996). The baculovirus/insect cell system as an

alternative to *Xenopus oocytes*. First characterization of the AKT1 K<sup>+</sup> channel from *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry. 271: 22863-22870.

- Gierth M.; P. Mäser. (2007). Potassium transporters in plants– Involvement in K<sup>+</sup> acquisition, redistribution and homeostasis. FEBS Letters 581:2348-2356.
- Gierth M.; P. Mäser; J. I. Schroeder. (2005). The potassium transporter AtHAK5 functions in K<sup>+</sup> deprivation-induced high-affinity K<sup>+</sup> uptake and AKT1 K<sup>+</sup> channel contribution to K<sup>+</sup> uptake kinetics in Arabidopsis roots. Plant Physiology 137:1105-1114.
- Grabov A. (2007). Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: Single family-multiple functions. Annals of Botany 99:1035-1041.
- Gurdon J. B.; C. D. Lane; H. R. Woodland; Marbaix G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. Nature 233:177-182.
- Haro R.; M. A. Bañuelos; A. Rodríguez-Navarro. (2010). High-affinity sodium uptake in land plants. Plant Cell Physiology 51:68-79.
- Haro R.; M. A. Bañuelos; M. E. Senn; J. Barrero-Gil; A. Rodríguez-Navarro. (2005). HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. Plant Physiology 139:1495-1506.
- Haro R.; M. A. Bañuelos; F. J. Quintero; F. Rubio; A. Rodriguez-Navarro. (1993). Genetic basis of sodium exclusión and sodium tolerance in yeast- A model for plants. Physiologia Plantarum 89:868-874.
- Haro R.; L. Sainz; F. Rubio; A. Rodríguez-Navarro. (1999). Cloning of two genes enconding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology 31:511-520.
- Hartt C.E. (1969). Effect of potassium deficiency upon translocation of 14C in attached blades and entire plants of sugarcane. Plant Physiology 44:1461-1469.

- Hille B. (2001). Ion channels of excitable membranes. Third Edition. Part II, Principles and mechanisms of function, charper 10: Elementary properties of ions in solutions, pp: 326-329, Sinauer Associates, Inc.
- Horie T.; A. Costa; T. H. Kim; M. J. Han; R. Horie; H. Y. Leung; A. Miyao; H. Hirochika; G. An; J. I. Schroeder. (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup> starved roots for growth. EMBO Journal 26:3003-3014.
- Huber S.C. & Moreland D.E. (1981) Co-transport of potassium and sugars across the plasmalemma of mesophyll protoplasts. Plant Physiology 67: 163-169.
- Huynh C. Q.; H. Zieler. (1999). Construction of modular and versatile plasmid vectors for the high-level expression of single or multiple genes in insects and insect cell lines. Molecular Biology 288:13-20. *In* Cultek. Aplicaciones: Sistema de expresión de proteínas: Sistemas de Expresión para la producción de proteínas heterólogas. [en línea]. Junio 2012. Disponible en la Web: http://www.cultek.com/aplicaciones. asp?p =Aplicacion\_Genica&opc=tecnicas#13.
- INEGI, Información Geográfica: Mapa de uso potencial Agrícola. http://mapserver. inegi.gob.mx/geografia/espanol/estados/yuc/tsuelosagr.cfm?c=444&e=27.Diciem bre 2009.
- Kannan S. (1971). Plasmalemma: the seat of dual mechanisms of ion absorption in *Chlorella pyrenoidosa*. Science 173:927-929.
- Kim E. J.; J. M. Kwak; N. Uozumi; J. I. Schroeder. (1998). AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transporter activity. The Plant Cell 10:51-52.
- Ko C. H.: R. F. Gaber. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Cell Biology 11:4266-4273.

Kochian L.V., Lucas W.J. (1988). Potassium transport in roots. Adv. Bot. Res., 15: 93-178.

Kost T. A.; J. P. Condreay. (1999). Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. Curren Opinion Biotechnology 10:428-433. *In* Cultek.

Aplicaciones: Sistema de expresión de proteínas: Sistemas de Expresión para la producción de proteínas heterólogas. [en línea]. Junio 2012. Disponible en la Web:

http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\_Genica&opc=tecnicas#13.

- Kumpf R. A.; D. A. Dougherty. (1993). A mechanism for ion selectivity in potassium channels: computational studies of cation-π interactions. Science 261:1708-1710.
- Lebaudy A.; A. A. Véry; H. Sentenac. (2007). K<sup>+</sup> channel activity in plants: genes, regulations and functions. Federation of European Biochemical Societies Letters 581:2357-2366.
- Lee S. C.; W. Z. Lan; B. G. Kim; L. Li; Y. H. Cheong; G. K. Pandey; G. Lu; B. B. Buchanan; S. Luan. (2007). A protein phosphorylation/deposphorylation network regulates a plant potassium channel. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:15959-15964.
- Leidi E. O.; V. Barragan; L. Rubio; A. El-Hamdaoui; M. T. Ruiz; B. Cubero; J. A. Fernandez; R. A. Bressan; P. M. Hasegawa; F. J. Quintero; J. M. Pardo. (2004). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. Plant Journal 61:495-506.
- Li L.; B. G. Kim; Y. H. Cheong; G. K. Pandey; S. Luan. (2006). A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K<sup>+</sup> channel for low-K response in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 12625-12630.
- Nelson D. L.; M. M. Cox. (2004). Lehninger Principles of Biochemistry. Fourth edition. Charper 27: Protein metabolism, pp 1062-1065, W. H. Freeman & Company.
- Maathius F. J. M. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. Plant Biology 12:250-258.
- Maathuis F. J. M.; D. Sanders. (1992). Plant membrane transport. Curren opinion Cell Biology 4:661:669.

- Martínez-Cordero M. A.; V. Martínez; F. Rubio. (2005). High-affinity K<sup>+</sup> uptake in pepper plants. Journal of Experimental Botany 56(416):1553-1562.
- Martínez-Cordero M. A.; V. Martínez; F. Rubio. (2004). Cloning and functional characterization of high-affinity K<sup>+</sup> transporter HAK1 of pepper. Plant Molecular Biology 56:413-42.1
- Marschner H. (1986). Mineral nutrition in higher plants. Charper 7: Functions of mineral nutrients: macronutrients. pp. 195-267.
- Martínez-Estévez M.; N. Ruiz-Lau; R. E. May-Uluac; A. Guzmán-Antonio; F. Quintal-Tun;
   R. Pacheco-Arjona. (2006). Dynamics and distribution of nutrients during the development of plantlets of habanero pepper. Hort Science 41(2):1-3.
- Mäser, P., B. Eckelman; R. Vaidyanathan; T. Horie; D.J. Fairbaim; M. Kubo; M. Yamagami; K. Yamaguchi; M. Nishimura; N. Uozumi; W. Robertson; M.R. Sussman; J.I. Schroeder. (2002). Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1. FEBS Letters 531:157-161.
- Mengel K. (2007). Potassium. In Handbook of Plant Nutrition. 91-120. Baker A. V. and D. J. Pilbeam; Eds; Taylor & Francis, Boca Ratan FL, USA.; en Wakeel A.; M. Farooq; M. Qadir; S. Schubert. (2011). Potassium substitution by sodium in plants. Plant Science 30:401-413.
- Moller I. S.; M. Gilliham; D. Jha; G. M. Mayo; S. J. Roy; J. C. Coates; J. Haseloff; M. Tester. (2009). Shoot Na<sup>+</sup> exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na<sup>+</sup> transport in Arabidopsis. Plant Cell 21:2163-2178.
- Munns R.; M.Tester. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review Plant Biology 59:651-681.
- Palmgren M.G. (2001). Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. Annual Reviu Plant Physiology Plant Molecular Biology 52: 817-845.

- Pandey S.; W. Zhang; S. M. Assmann. (2007). Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. FEBS Letters 581:2325-2336.
- Pauling L. (1927). The size of ions and the structure of ionic crystals. Journal of the American Chemical Society 49:769-790. In Aidley D. J.; P. R. Stanfield. (2003). Ion channel: Molecules in action. Charper 2: Ions on the move, pp 17-19, Cambridge University Press.
- Peel A. J.; S. Rogers (1982). Stimulation of sugar loading into sieve elements of willow by potassium and sodium salts. Planta 154:94-96.
- Pérez D. Y.; I. Galindo; F. Arvelo. (2007). La muerte celular programada en las plantas: ¿Es semejante a la apoptosis en animales? Interciencia 32(12): 812-818.
- Pitman, M.G. (1972). Uptake and transport of ions in barley seedlings 111. Correlation between transport to the shoot and relative growth rateo. Aust. J. Biol. Sci. 25:905-919.
- Quintero F. J.; M. R. Blatt. (1997). A new family of K<sup>+</sup> transporters from Arabidopsis that are conserved across phyla. FEBS Letters 415:206.211.
- Ramos J.; R. Alijo: R. Haro y A. Rodríguez-Navarro. (1994). TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology 1176:249:252.
- Ramos J.; P. Contreras; A. Rodríguez-Navarro. (1985). A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology 143:88-93.
- Riesmeier J. W.; L. Willmitzer; W. B. Frommer. (1993). Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. EMBO Journal 11:4705-4713.
- Rigas S.; G. Desbrosses; K. Haralampidis; F. Vicente-Agullo; K. A. Feldmann, A. Grabov. (2001). TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in Arabidopsis root hairs. The Plant Cell 13:139–151.

- Roldán M. F.; C. A. Venialgo; N. C. Gutiérrez. (2004). Potasio disponible, de reserva y energía de reemplazamiento en suelos y el nivel foliar en rye-grass. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Cátedra de Conservación y Manejo de Suelos-Facultad de Ciencias. Agrarias- UNNE.
- Rodriguez-Navarro A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. Biochimica et Biophysica Acta 1469:1-30.
- Rodriguez-Navarro A.; M. R. Blatt; C. L. Slayman. (1986). A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. Journal of General Physiology 87: 649-674.
- Rodriguez-Navarro A.; F. Rubio. (2006). High-affinity potassium and a sodium transport systems in plants. Journal Experimental Botany 57:1149-1160.
- Rubio F.; G. E. Santa-María; A. Rodríguez-Navarro. (2000). Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. Physiologia Plantarum 109:34-43.
- Rubio L.; A. Rosado; A. Linares-Rueda; O. Borsani; M. J. García; V. Valpuesta; J. A. Fernández; M. A. Botella. (2004). Regulation of K<sup>+</sup> transport in tomato roots by the *TSS1* locus. Implications in salt tolerance. Plant Physiology 134: 452-459.
- Russel S. (1992). Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas. Capitulo 22: Potasio, sodio, calcio, magnesio, azufre y silicio. pp. 782-799, Ediciones Mundi-Prensa.
- Santa-María G. E.; F. Rubio; J. Dubcovsky; A. Rodríguez-Navarro. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. Plant Cell 9:2281-2289.
- Schachtman D. P., Schroeder J. I., Lucas W. J., Anderson J. A., Gaber R. F. 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. Science 258: 1654-1658.
- Schachtman D.P.; J. I. Schroeder. (1994). Structure and transport mechanism of a highaffinity potassium uptake transporter from higher plants. Nature 370:655-658.

- Schobert C.; W-J. Zhong; E. Komor. (1998). Inorganic ions modulate the path of phloem loading os sucrose in *Ricinus communis* L. seedlings. Plant Cell and Environment 21:1047-1054.
- Schulzs E. D.; E. Beck; K. Muller-Hohenstein. (2002). Plant Ecology. Charper 2: Autecology: Whole plant ecology. pp 338-345.
- Sentenac H.; N. Bonneaud; M. Minet; F. Lacroute; J-M. Salmon; F. Gaymard; C. Grignon. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. Science 256: 663-665.
- Shin R.; D. P. Schachtman. (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:8827-8832.
- Soria F. M.; A. Trejo; J. Tun; R. Saldívar. (2002). Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) SEP. SEIT. Instituto Tecnológico Agropecuario de Conkal, Yucatán. Pág. 1-21.
- Spalding E. P.; R. E. Hirsch; D. R. Lewis; Z. Qi; M. R. Sussman; B. D. Lewis. (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: Inhibition by a ammonium and stimulation by sodium. Journal Gen Physiology 113:909-918.
- Swya K.; U. Kafkafi. Potassium uptake by plants a their various physiological stages. The Hebrew University of Jerusalem, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, Rehovot, Israel. pp. 263-303. http://www.lpipotash.org/udocs/ Sesion%20V.pdf. Octubre 2008.
- Szczerba M.; D. T. Britto; S. A. Ali; K. D. Balkos; H. J. Kronzucker. (2008). NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-stimulated and –inhibited components of K transport in rice (*Oryza sativa* L.). Jounal of Experimental Botany 59(12):3415.3423.
- Sze H.; T.K. Hodges. (1977). Selectivity of alkali cation influx across the plasma membrane of oat roots. Plant Physiology 59:641-646.

- Torres, C. A.; A. M. González. (2004). Mecanismos de transporte a través de la membrana explicados por medio de animaciones. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: B055. http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/6-Biologia/B-055.pdf. Octubre 2008.
- Tun D. J. de la C. (2001). Chile Habanero: Características y Tecnología de Producción. Centro de Investigación Regional del Sureste. Mocochá, Yucatán. pp 5-17.

Urbano-Terrón P. (1992). Tratado de fitotecnia general, 2ª ed. mundi-prensa libros, S.A.

- Venema K.; F.J. Quintero; J.M. Pardo; J.P. Donaire. (2002). The *Arabidopsis* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in reconstituted liposomes. Journal of Biological Chemistry 277:2413–2418.
- Vidal M.; A. M. Buckley; F. Hilger; R. F. Gaber. (1990). Direct selection of mutants with increased K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cervisiae*. Genetics 125:313-320.
- Wakeel A.; M. Farooq; M. Qadir; S. Schubert. (2011). Potassium substitution by sodium in plants. Plant Science 30:401-413.
- Walker D. J.; R. A. Leigh; A. J. Miller. (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells (cytosolic K<sup>+</sup>/cytosolic pH/plant vacuole). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93:10510-10514.
- Wang J. J.; L. D. Harrel; F. B. Bell. (2004). Potassium buffering characteristics of three soils low in exchangeable potassium. Soil. Sci. Am. J. 68:654-661.
- Wang Y. H.; D. F. Garvin; L. V. Kochian. (2002). Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium and iran deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere mediated signals. Plant Physiology 130:1361-1370.
- Wan Y.; W. H. Wu. (2010). Plant sensing and signaling in response to K<sup>+</sup> deficiency. Molecular Plant 3:280-287.

- Wilson E.M. 1980. Physical geography of the Yucatan peninsula. pp. 5-40. In: E. H. Moseley y E. D. Terry (eds.). Yucatan a world apart. University of Alabama. Tuscaloosa, AL.
- Yu S. P. (2003). Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. Prog Neurobiology 70:363-386.
- Zhao J.; N. H. Cheng; C. M. Motes; E. B. Blancaflor; M. Moore; N. Gonzales; S. Padmanaban; H. Sze; J. M. Ward; K. D. Hirschi. (2008). AtCHX13 is a plasma membrane K<sup>+</sup> transporter. Plant Physiology 148:796-807.

En línea:

- (http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\_Genica&opc=tecnicas.CultekS.\_L. U). Sistemas de Expresión para la producción de proteínas heterólogas. Enero 2009.
- (http:// iescarin.educa.aragon.es/depart/biogeo/varios/BiologiaCurtis/Indie%20de% 20 se cciones.htm). Permeabilidad de la bicapa lipídica. Sección 1, Capítulo 6.
- (http://www.ipni.net/ppiweb/mexnca.nsf/\$webindex/7F825355F0D0EA4B06256BB100793 3BE). El potasio en los sistemas de fertigación: consideraciones generales para el uso del potasio en sistemas de fertigación. International Plant Nutrition Institute (IPNI).

## CAPÍTULO II

# CLONACIÓN DE UN TRANSPORTADOR DE POTASIO TIPO HAK1 A PARTIR DE RAÍCES DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO (C. chinense Jacq).

## 2.1 INTRODUCCIÓN

El K<sup>+</sup> tiene un papel importante en las células vegetales, participando en los procesos de osmorregulación y mantenimiento de la turgencia, control del potencial de membrana, síntesis proteica, o en la activación de distintas enzimas (Clarkson y Hanson, 1980; Maathuis y Sanders, 1996). Por ese motivo, su mecanismo de transporte ha sido extensamente estudiado, tanto mediante el uso de técnicas electrofisiológicas y radiométricas, como, más recientemente, mediante técnicas genéticas y moleculares. El transporte activo de K<sup>+</sup> ha sido asociado a la actividad de transportadores, proponiéndose como probable mecanismo un simporte K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Kochian y Lucas, 1988), dado que las principales bombas primarias en las células vegetales son H\*-ATPasas. Una de las principales familias de transportadores son la familia KT/HAK/KUP, la cual se han encontrado en diversos organismos que evolutivamente van desde las algas verdes hasta las angiospermas. La presencia de estos genes en plantas implica su importante participación en la adquisición de un nutriente esencial como es el K\* y en la habilidad de las plantas a sobrevivir en ambiente deficientes en este ion (Grabov, 2007) y estos transportadores, exhiben una alta y baja afinidad por el K\*. (Bañuelos et al., 1995; Santa-María et al., 1997; Fu y Luan, 1998; Rubio et al., 2000; Bañuelos et al., 2002).

Para conocer más sobre este mecanismo de toma de K<sup>+</sup> se aisló el ADNc total de un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad de raíces de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.); asimismo, se realizó el análisis *in silico* de la proteína.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.2.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Semillas (SEMINIS) de chile habanero (*C. chinense* Jacq.) fueron previamente desinfectadas con etanol al 80% e hipoclorito de sodio al 30% (comercial), prehidratadas durante 72 h y germinadas en recipientes con vermiculita y agua grado milli Q (con una concentración de 1.6 mM K<sup>+</sup>) (Figura 2.1). Las condiciones de germinación fueron: una temperatura 25°C y un fotoperiodo de 16 h luz.

anto de truncorte La ella anteas ainstrofrictórical y genéticas y moniciarial El aborienterio procon tratosa acces 1963) deda que la acces y y an la habi ded un can (Graboy, 2007) y estas bañuelos el el, 1985 Sente-



Contenting to install
 Contenting to install

Figura 2.1 Germinación de semillas de *C. chinense Jacq*. en recipientes con vermiculita.

## 2.2.2 CULTIVO DE PLANTAS DE CHILE HABANERO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE POTASIO

Se ha reportado que la expresión de los transportadores pertenecientes a la familia KUP/HAK/HKT, puede aumentar en condiciones de ausencia de K<sup>+</sup>. Por lo tanto, para

asegurar la expresión del transportador en las raíces de chile habanero, plántulas con 75 días después de la germinación fueron colocadas en solución Hoagland (Cuadro 2.1) en presencia o ausencia de KNO<sub>3</sub> durante 15 días (Figura 2.2), periodo durante el cual se tomaron muestras de la solución para determinar la concentración de K<sup>+</sup> durante el tratamiento. Posteriormente, se colectó la parte aérea y el sistema radicular, ambas muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.



**Figura 2.2** Tratamiento en presencia o ausencia de K<sup>+</sup>. A) Desarrollo en solución Hoagland en presencia o ausencia de K<sup>+</sup>. B) Apariencia de las plántulas al finalizar el tratamiento.

HOAGLAND 1	.4 mM K <sup>+</sup>	HOAGLAND	SIN K <sup>+</sup>
Sales	[µM]	Sales	[µM]
CaCl <sub>2</sub>	50	CaCl <sub>2</sub>	50
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12.5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12.5
MnSO <sub>4</sub>	1 00	MnSO <sub>4</sub>	1
ZnSO4	1	ZnSO₄	1
CuSO4	0.5	CuSO <sub>4</sub>	0.5
(NH4)6M07O24	0.1	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0.1
NICI	0.1	NICI	0.1
Fe-EDTA	10	Fe-EDTA	10
	[mM]		[mM]
KNO <sub>3</sub>	1.2	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.1
$Ca(NO_3)_2$	0.8	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.4
KH2PO4	0.2	MgSO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub>	0.2		

Cuadro 2.1 Composición de la solución Hoagland ( $^{1}/_{5}$  de su fuerza iónica) con y sin K<sup>+</sup>.

#### 2.2.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTERNO DE K<sup>+</sup> EN EL TEJIDO

Las raíces fueron separadas de la parte aérea, y ambos tejidos fueron pesados y secados durante 72 h en una estufa a 60°C para obtener el peso seco; la determinación del contenido de K<sup>+</sup> en la parte aérea y en la raíz se realizó mediante la digestión ácida de los tejidos con una solución de 0.2 M HCl y 10 mM MgCl<sub>2</sub> durante aproximadamente 12 h. La concentración del catión se determinó en un espectrofotómetro de absorción atómica modelo 2380 Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA).

## 2.3 EXTRACCIÓN DE ARN

Se utilizó tejido de raíz de plántulas de chile habanero (*C. chinense* Jacq.) cultivadas durante un periodo de diez días en solución Hoagland (Cuadro 2.1) en ausencia y presencia de K<sup>\*</sup>. Para la extracción se empleó el paquete NucleoSpin RNA Plant siguiendo las especificaciones del fabricante (Macherey-Nagel). El ARN se resuspendió en 60  $\mu$ L de agua libre de RNasas. La concentración de ARN obtenida fue de 114.18 y de 156.22 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> en presencia y en ausencia de K<sup>\*</sup>, respectivamente.

## 2.4 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La concentración de ADN y ARN se estimó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) y mediante la comparación de las intensidades de las bandas separadas por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y como estándar del tamaño de las masas moleculares, se utilizó el  $\lambda$  *Hind*III (ADN del fago  $\lambda$ , cortado con la enzima de restricción *Hind*III).

# 2.5 AMPLIFICACIÓN DE UN PRIMER FRAGMENTO INTERNO DE UN TRANSPORTADOR DE POTASIO TIPO HAK1

## 2.5.1 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RT-PCR

Para la síntesis ADNc se utilizó el paquete First-strand cDNA synthesis marca GE Healthcare siguiendo las instrucciones del fabricante; partiendo de una concentración aproximada de 156.22 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> de ARN. El ADNc se sintetizó con el paquete 1 st Strand cDNA Synthesis for RT-PCR (AMV) siguiendo las especificaciones del fabricante (ROCHE).

Para la amplificación por PCR se utilizaron oligos específicos de *Capsicum annuum* (CaHAK) (Martínez-Cordero *et al.*, 2004). Las condiciones fueron las siguientes: 94°C 2 min; 94°C 30 s; 51°C 30 s; 72°C 48 s (25 ciclos), 72°C 10 min y 4°C; para la reacción se utilizó la enzima Taq DNA polymerase (Roche). Los productos de la reacción se verificaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio.

#### 2.5.2 CLONACIÓN Y TRANFORMACIÓN

El fragmento amplificado mediante RT-PCR fue clonado en el vector pCR2.1-TOPO utilizando el paquete TOPO TA Cloning (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA).

La transformación por choque térmico se realizó en células competentes de *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ ), con las siguientes indicaciones: se adicionó el vector con el inserto y después las células se incubaron durante 30 s a 42°C, inmediatamente se colocó 2 min a 4°C y se les añadió 900 µL de medio LB + 20% Glucosa. Posteriormente fueron incubadas en un orbitador durante 2 h a 37°C; para finalmente crecer en cajas petri con medio LB (más ampicilina [1 mg mL<sup>-1</sup>] y X-gal [20 mg mL<sup>-1</sup>]) a una temperatura de 37°C durante 12 h.

#### 2.5.3 PURIFICACIÓN Y DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO (pCR2.1-TOPO + CcHAK1)

Se seleccionaron al azar un mínimo de 20 colonias transformadas; las cuales fueron subcultivadas en tubos de cultivo con 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina. Se incubó en un orbitador a 37°C durante 12 h. Para la purificación del plásmido se empleo el Kit NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL) siguiendo las especificaciones del fabricante. La digestión se realizó con la enzima *EcoR* I (Roche) y la presencia del inserto se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Las clonas seleccionados con el fragmento de interés fueron secuenciados por ambos extremos en el vector pCR2.1-TOPO con los oligonucleótidos universales (T7 y R24).

#### 2.6. OBTENCIÓN DEL ADNC DE UN TRANSPORTADOR TIPO HAK

#### 2.6.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS

ma manufacture of the real viscous to Arrested as present at 70 at

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de los extremos 5' y 3' utilizando el software Oligo 4 (Cuadro 2.2), esto a partir de una secuencia de 843 pb previamente amplificada a partir del ADNc de chile habanero mediante oligos específicos de *C. annuum* (CaHAK1).

Cuadro 2.2 Oligonucleótidos específicos empleados para la amplificación de los extremos 5'y 3' mediante el protocolo de RACE.

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Observaciones
CcHAK1-1	TACAACAACAAGTCCATTCAAG	Oligonucleotido específico diseñado a partir de la secuencia obtenida de 843 pb CcHAK1 para amplificar el extremo 3'.
CcHAK1-1R	CCATGAGAATAAAGTAATCCACC	Oligonucleotido específico
CcHAK1-2R	CTAATGTATTCACTGGAAACCT	diseñado a partir de la secuencia obtenida de 843 pb CcHAK1 para amplificar el extremo 5'.
CcHAK1-3R	ATGATTGGACACAGTTTCAGGG	Oligonucleotido específico
CcHAK1-4R	GCTGGAAATACGAGGCAACTGA	diseñado a partir de la secuencia obtenida de 540 pb CcHAK1 para amplificar el segundo fragmento del extremo 5'.
CcHAK1-5R	CTATGTCTGATCCGTTGGGCTCT	Oligonucleotido específico diseñado a partir de la secuencia
CcHAK1-6R	CTCTATCTTCTGGCTCCTGGTTT	obtenida de 637 pb CcHAK1 para amplificar el segundo fragmento del extremo 5'.

#### 2.6.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' DE CCHAK1

Para la síntesis ADNc se utilizó el paquete First-strand cDNA synthesis marca GE Healthcare siguiendo las especificaciones del fabricante y el paquete AffinityScrip Multiple Temperature Reverse Transcriptase (STRATAGENE) para la obtención del último fragmento del extremo 5'. Los extremos 5'y 3' se amplificaron mediante el protocolo 5'/3' RACE Kit, 2<sup>nd</sup> Generation (Roche), siguiendo las especificaciones del fabricante y la enzima empleada en las reacción de PCR fue la High Fidelity polymerase (Roche). Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA), transformados en *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ ) como se menciona en las secciones 2.5.2 de la metodología y posteriormente secuenciados en ambos extremos con los oligos universales (T7 y R24) para el vector.

## 2.6.3 OBTENCIÓN DEL ADNC DE CCHAK1

Una vez determinada la secuencia para cada uno de los extremos, se diseñaron oligonucleótidos específicos desde el codón de inicio ATG en el extremo 5' y el codón de terminación STOP en el 3', a estos oligonucleótidos se les agregó el sitio de corte para las enzimas de restricción *Xba I* y *Eco RI* en los extremos 5'y 3' respectivamente, con el objetivo de dirigir la inserción del fragmento en el vector de expresión para levadura, al igual que una secuencia en el extremo 5' que favorece la traducción de la proteína en la levadura.

El ADNc se sintetizó a partir de ARN de raíz en ausencia de K<sup>+</sup> utilizando el paquete AffinityScrip Multiple Temperature Reverse Transcriptase (STRATAGENE) siguiendo las especificaciones del fabricante. El fragmento se amplificó mediante RT-PCR, utilizando la enzima PfuUltra polymerase (Roche); se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA) y se transformó en *E. coli* (cepa DH5α). Para la purificación del ADN plasmídico se utilizó el Kit NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL). Las clonas seleccionados fueron secuenciados utilizando los oligonucleótidos universales del vector pCR2.1-TOPO, dos juegos de oligonucleótido específico uno de CcHAK1 y otro de *C. annuum* utilizados en la obtención de los extremos 5' y 3' del ADNc, para obtener los fragmentos correspondientes a el ADNc de CcHAK1 (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3 Oligonucleótidos específicos empleados para amplificar y secuenciar el ADNc total de CcHAK1.

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Observaciones
CcHAK1-ATG amb	G <u>TCTAGA</u> AAACAATGGCTAGCTC AGATAGTGAT	Oligonucleotido específico diseñado a partir de la secuencia obtenida de CcHAK1, incluye diana Xba I.
CcHAK1-STOP	C <u>GAATTC</u> GTTATACCTCATAAGT CATGCCAACC	Oligonucleotido específico diseñado a partir de la secuencia obtenida de CcHAK1, incluye diana <i>Eco RI</i> .
CaHAK1F	ACTTCCTCATGATTGCTTGTG	Oligonucleotido específico de C. annuum (CaHAK1) (Martínez- Cordero et al., 2004)
CcHAK1-1R	CCATGAGAATAAAGTAATCCACC	Oligonucleotido específico diseñado a partir de la secuencia obtenida de 843 pb CcHAK1 para amplificar el extremo 5'.

## 2.7 ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS

Para el alineamiento de secuencias se empleo el programa: Clustal W2 (disponible en Internet, http://www.ebi.ac.uk/Tool/clustalw2/index.html). Para identificar las secuencias obtenidas de los insertos, se empleó la herramienta *on line* BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) en su modalidad *tblastx*. Dicha variante traduce la secuencia de nucleótidos en los seis marcos de lectura posibles y compara las secuencias aminoacídicas resultantes con una base de datos que incluye todas las secuencias aminoacídicas disponibles, así como las que resultan de traducir todas las secuencias nucleotídicas disponibles en el NCBI.

La determinación de la masa molecular y el punto isoeléctrico de CcHAK1 se realizó con el programa (http://expasy.org/cgi-bin/pi\_tool). Para predecir el perfil de hidrofobicidad se emplearon los programas TopPrep-Topology prediction of membrane proteín (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?=toppred), TMpred (http://www.Ch.embnet.Org /software/TMPRED\_form.html), TMHMM (http://www.cbs .dtu.dk/service/TM MMM/). El perfil de fosforilación se predijo mediante el programa NetPhos 2.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/).

## 2.8 EXPRESIÓN SEMICUANTITATIVA DE CCHAK1

Se utilizó 0.1 g de tejido de raíz de plántulas de chile habanero (*C. chinense* Jacq.) cultivadas durante un periodo de diez días en solución Hoagland (Cuadro 2.1) en ausencia y presencia de K<sup>+</sup> (con o sin 10 mM NaCl). Para la extracción se empleó el método de TRIZOL (SIGMA). El ARN se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua libre de RNasas. Se comprobó su integridad en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, aplicando una concentración de 1  $\mu$ g de ARN por tratamiento.

La síntesis de primera cadena se realizó utilizando el Kit First strand cDNA synthesis kit por RT-PCR (AMV) (ROCHE), siguiendo las especificaciones del fabricante y a partir de 1 µg de ARN.

Para obtener un fragmento de CcHAK1 de aproximadamente 352 pb, se realizó un PCR a partir de una mezcla de reacción que contenía: 2.5  $\mu$ L de buffer 10X (Invitrogen) para PCRM, 1  $\mu$ L de MgCl 50 mM, 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 2  $\mu$ L de oligonucleótidos 10 pmoles mL<sup>-1</sup> (CcHAK1-1: TACAACAACAAGTCCATTCAAG y CcHAK1-STOP: CGAATTCGTTATACCTCATAAGTCATGCCAACC), 1  $\mu$ L de enzima Taq polimeras (1 unit  $\mu$ L<sup>-1</sup>) (Invitrogen) en un volumen final de 25  $\mu$ L.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C 30 s, 55°C 30s, 72°C 40s; 30 ciclos y 72°C 10 min; un ciclo. Los productos de la reacción se verificaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se utilizó como estándar de carga la expresión del ARN ribosomal 18S.

## 2.9 RESULTADOS

#### 2.9.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTERNO DE POTASIO EN EL TEJIDO

Se determinó la concentración de K<sup>+</sup> interno en los tejido de las plántulas de *C. chinense* Jacq. (Cuadro 2.4), las cuales fueron tratadas con solución Hoagland en ausencia y presencia de KCI. Los valores obtenidos en las plántulas en presencia de K<sup>+</sup> fueron casi tres veces mayor comparados con los determinados en ausencia del ion. Esto demuestra que en las plántulas que estuvieron en ausencia de K<sup>+</sup> durante su crecimiento se afecto el contenido de este ion.

Cuadro 2.4 Contenido interno de K<sup>+</sup> en plántulas de C. chinense en ausencia y presencia de K<sup>+</sup>.

	Solución Hoagland	
TEJIDO	*Ausencia de K*	*Presencia de K*
Parte aérea	559.14	1654.21
Raíz	368.64	1598.98

\*valores en nmol K<sup>+</sup> mg<sup>-1</sup> PS

## 2.9.2 AMPLIFICACIÓN DE UN PRIMER FRAGMENTO Y OBTENCIÓN DEL ADNC DE UN TRANSPORTADOR TIPO HAK

Con la técnica de RT-PCR se logró amplificar un fragmento de 843 pb, el cual mediante la secuenciación y el análisis de las secuencias se comprobó que codifica para un posible transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad; presentando una identidad del 98% con el transportador de K<sup>+</sup> tipo HAK1 de *C. annuum* (CaHAK1) (Martínez-Cordero *et al.*, 2004). La amplificación de este fragmento se realizó utilizando los oligos específicos para *C. annuum* (CaHAK1).

#### CAPÍTULO II

La obtención del ADNc del transportador se realizó con la amplificación de los extremos 5'y 3' mediante el protocolo 5'/3' RACE Kit, 2<sup>nd</sup> Generation (ROCHE). Los oligos específicos que se diseñaron (Cuadro 2.2) fueron utilizados para amplificar los extremos. Cada fragmento obtenido para cada uno de ellos fue secuenciado, y comprobada su identidad. Para amplificar el fragmento completo del ADNc mediante RT-PCR se utilizó un juego de oligos específicos (Cuadro 2.3), y se amplificó desde el codón de inicio hasta el codón de terminación. El producto de PCR obtenido fue del tamaño esperado, un fragmento de aproximadamente 2300 pb (Figura 2.3).



**Figura 2.3** Amplificación por RT-PCR del fragmento CcHAK1 a partir de raíces de chile habanero (*C. chinense* Jacq.). M: Marcador de peso molecular ( $\lambda$ HindIII), 0: Control negativo sin ADNc, 1: 5  $\mu$ L de ADNc. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; T<sub>m</sub>: 51°C, Mg<sup>2+</sup>: 2 mM.

BU SHE I LES MODULINO Y OTHERDAY TEMPT NO HU INVOLUSION

El fragmento fue denominado CcHAK1 (por *C. chinense*), y se clonó en el vector pCR2.1-TOPO y se digirió dos veces con tres enzimas de restricción. La primera digestión con *Eco RI* y *BamH I* resultado en un patrón de dos fragmentos (7343 pb + 1486 pb) (Figura 2.4A) y la segunda con *Nsi I*, la cual nos proporcionó un patrón de tres fragmentos (3746 pb + 3125 pb + 1930 pb) (Figura 2.4B). Con esto se comprobó su inserción y se determinaron las clonas a secuenciar.



**Figura 2.4** Patrón de fragmentos obtenidos con la digestión de CcHAK1. Enzimas de restricción: A) *Eco RI* + *BamH I* B) *Nsi I*. Tamaño de ADNc 2435 pb. A la derecha se ilustra los sitios de cortes para las enzimas de digestión en el vector de expresión taransformado con CcHAK1. Del 1al 5: diferentes clonas digeridas.

# 2.9.3 COMPARACIÓN Y GENERACIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO DE CCHAK1 CON OTROS HAK'S DE OTRAS ESPECIES

Las clonas seleccionados de CcHAK1, fueron secuenciados y su identidad comprobada con el programa BLASTx; el cual arrojo una identidad del 99% con CaHAK1 (AY560009) y de un 84% con SIHAK5 (350539057). Posteriormente se realizó un alineamiento de

## CAPÍTULO II

CcHAK1 mediante un ClustalW2 con la de otros transportadores ya reportados (Figura 2.5) arrojando un identidad del 99% con CaHAK1 y un 85% con SIHAK5. En este alineamiento se puede apreciar los aminoácidos conservados entre los transportadores seleccionados para el análisis. Destaca la presencia de una secuencia muy conservada en el primer segmento transmembranal, siendo la secuencia consenso GVVYGDLGTSPLY, (los aminoácidos en negritas están conservados en todos los transportadores) habiéndose postulado la implicación de esta región en la formación de un presumible dominio P (Rodríguez-Navarro, 2000).

Entre las secuencias de CcHAK1 y CaHAK1 se observo una diferencia de solo siete aminoácidos entre ellas (Figura 2.5).

CcHAK1	MASSDSDHHTDQETVNGGQLKDRKVSWAKLARVDSLNLEAGKVSSTPENHNS	52
CaHAK1	MASSDSDHHTDQEVVNGGQLKDRKVSWAKLARVDSLNLEAGKVSSTPENHNS	52
LeHAK5	MESTKSEEEVNVGQQQLKDRKVSWAKLGRVDSLNMEAGKVSSTQARHGS	49
AtHAK5	MDGEEHQIDGDEVNNHENKLNEKKKSWGKLYRPDSFIIEAGQTPTNTG-RRS	51
ThHAK5	MDGEEHQIDG-EVNNQEHNHDHEHKLKEKKKSWGKLFRPDSFSIEAGKTPKNTG-HSS	56
OsHAK1	LKRHDSLFGDAEKVSGGKHHGGS	23
HvHAK1	MSLQVEDPRSAETPAPLKREDSLFGDAEKVSDSKHEG-S	38
MCHAK1		13
McHAK2	LTYGKCWGSNKEN	15
AtKT1	MNQSPSLIEQGISQQHLKTL	20
HVHAK2	MVVVSQGQWK	10
AtHAK1	MAARVEAATMGGEIDEEESDERGSMWDLDQKLDQSMDEEAGRLRNMYREK	50
OsHAK12	MASISDSETTNHGSIWDLDQNLDQPMDEEASRLKNMYTEK	40
OsHAK17	MWFIALLRCVPNRNLKYHLCVLQFILMFSLNSEQ	34

CcHAK1	TADWKTVLS AFQSV VIY DIGT TAN FASTFTDKIGHKDDIL VL LIIYTIIL 10	09
CaHAK1	TADWKTVLSLAFQSVGVIY DIGT FASTFTDKIGHKDDIL VL LIIYTIIL 10	09
LeHAK5	KGDWKTILS AFQSVGVIY DIGT LYVFASTFTDEIKHKDDIL VL LIIYTIML 10	06
AtHAK5	LMSWRTTMS AFQSLOVVY DIGT UNYVASTFTDGINDKDDVV VL LIIYTITL 10	80
ThHAK5	LLSWRTTMS AFQSLSVVY DIGT VASTFTEGINDKDDVI VL LIIYTLTL 1	13
OsHAK1	AVSWAVTLH AFQSV IIY DIGT YLYVYSSTFPDGIGHRDDLV VL LILYTLII 80	0
HvHAK1	QVSWMRTLS AFQSVGIIYGDIGTS LYVYSSTFPDGIKNRDDLLGVL LILYTLII 95	5
McHAK1	SWKTVLT AYQSLGVVYGDLATS	1
McHAK2	SWKTIMV AYQSLGVVYGDLSIS	3
AtKT1	SCANVLT AYQSLGVIYGDLSTS	8
HvHAK2	YHKALSL AFQSFGVVYGDLSTS / JFKSALSG-LDDYSDEATVF LFELIFWTLTL 6	7
AtHAK1	KFSALLLLQ SFQSLGVVYGDLGTS VYVFYNTFPHGIKDPEDIICAL LIIYSLTL 1	07
OsHAK12	KFSSILLLR AFQSLGVVFGDLGTS / WUFYNIFPHGVDDDEDVI AL LIIYTLTL 9'	7
OsHAK17	DSNVWKDLF AYKTL VVF GLVT VYPSMNLSSPTEADYL IY IMFWTLTL 90	0
	***************************************	

CcHAK1 CaHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OsHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1 OsHAK12 OsHAK17	VPMT ST FIVLW NNN DE AFLLYS LCYAKVSLIPNQEPEDRELSHYSLDIPSN-HI VPMT ST FIVLW NNN DE AFLLYS LCYAKVSLIPNQEPEDRELSHYSLDIPSN-HI VPMT ST FIVLW NNN DE AFLLYS LCYKVSLIPNQEPEDRELSHYSLDIPSN-HI VALL FIVLQ NDN EGGTFLE ICYKVSLIPNQEPEDVELSNYTLELPT-QL VALL FIVLQ NDN ETTFLE ICYKKGLIPNQEPEDSELSNYTLELPT-QL VALL FIVLQ NDN ETTFLE ICYKKGLIPNQEPEDSELSNYTLELPT-QL VALL FIVLQ NDN ETTFLE ICYKKGLIPNQEPEDSELSNYTLELPT-QL VALL FIVLQ NDN ETTFLE ICYKKGLIPNQAEDAVSNYSIEAPSS-QL IPML FIVLY NDN DE TFLE ISYKIRIPNQAEDAVSNYSIEAPSS-QL IPML FIVLR DDN ETTFLE ICH KVSLIPNQAS DEDVSTYKMEHPP-ET IPLL FIVLR DDN ETTFLE ICH KVSLIPNQAS DEDVSTYKMEHPP-ET IALF FIVLS DDN ETTFLE ICH KVSLIPNQAADEELSTYYQPGVD-RT IPLL FIVLR DDN ETTFLE ICH KVSLIPNQAADEELSTYYQPGVD-RT IPLL VFVVCK NDN OF TFLE ICH KVSTIPNQHKTDEELTYSRTTFH-EH IPLM FVVLR NDN OF TFLE ICH KVSTIPNQHKTDEELTYSRTTFH-EH IPLM FVVLR NDN OF TFLE ICH KVSTIPNQHKTDEELTYSRQTYE-EN IGVVKYYCIALN DDH ETTFLE ICH KVSTIPNQHKTDEELTYSRQTYE-EN	168 165 167 172 139 154 131 131 136 125 165 155 147
CcHAK1 CaHAK1 LeHAK5 AtHAK5 TbHAK5	RRAQRIRHSL KSKFAKT FUVFLAIL TSMVIG GV 7 CI 2LS VS IKPLGQ RRAQRIRHSL KSKFAKFT VFLAIL TSMVIG GV 7 CI LS VS IKPLGQ KRAQRIRQGL KSKFAKIF VFLAIL TSMVIGV 7 CI LS VS IKPLGQ RRAHMIKEKL NSKFAKII FLVTIM TSMVIGI 5 CI LS VS IKSLGQ DESHKIKEKI NSKFAKII FLVTIM TSMVIG CI SI LS VS IKSLGQ	223 223 220 222 227
OsHAK1	RRAOWVKHKL SSRAAKMA FFLTIL TSMVM GTLTAT ALS VS TREKAP-NLTO	198
HvHAK1	KRAOWLKOKL SSKAAKIV FTLTIL TSMVI GT TRAIMLS VS IREKAP-SLTO	213
McHAK1	DPRSSLKLTL KHKVLHKVTLILALI ACMVI GV AL VFS VS LELSTSKEHHG	191
MCHAK2	RSTSKVKTVL KHKGLHTALVLVLL TCMVV GL TPAIN FTAVS LESLMS-QHHQ	190
AtKT1	ROSAAVKSFF KHPKSQKC LLFVLL TCMAI SVITPTIMPSIVSTVKLKIPNLHEN	196
HVHAK2	AMSSPFKRFL KHKKLRTC LLFVLF ACMVI GVITTI VLALLS LQDKDTGGLGN	185
AtHAK1	SFAAKTKRWLEKRTSRKTALLILVLVETCMVI GILSAI VLSAGELRVNLP-HISN	224
OsHAK12	SLAAKIKRWLEGHVYKKNCLILVLIETCTAIGEGILTPAINVLSESG IRVQNQ-KMST	214
OsHAK17	RRPSRLGKFF QSITARRV LFVAVL MCMLIS GILINAI LS ID IRGPFP-TVSK	206
CcHAK1 CaHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OsHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1 OsHAK12 OsHAK17	EAVVGISVAI TAL CA RF DK GYT A AICI FMFISGI LYNLFKYDVSVLR FN EAVVGISVAI YAL CA RF DK GYT A AICI FMFISGI LYNLFKYDVSVLR FN DAIMGISIAI VIL SL RM DK GYT A AICV FLFISGI LYNLFKYDVVLR FN NTVVGVSVAI IVL AF RF DK GFS A IILV FTFLIGI LFNLFKHDITVLK LN TQVVLISVAI FML SV RF DK GFS A IIFV FMFLTGI LVNLFKHDITVLK LN TQVVLISVAI FML SV RF DK GYT A VISV FLLIAGI LYNLVHUIGVLR FN YQVVLISVAI FML SV RF DK GYT A VISV FLLIAGI LYNLVHUFTILK FN TQVVLISVAI FML SV RF DK GYT A VISV FLLIAGI LYNLVHUFTILK FN TQVVLISVAI FML SV RF DK GYT A VISV FLLIAGI LYNLVHUFTILK FN YQVVLISVAI FML SV RF DK GYT A VISV FLLIAGI MYNLVVHDIGVLR FN YQVVLISVAI FML SV RF DK GYT A VISV FLLIAGI MYNLVYNPHVRLS SVVVI-IACII VAIFSV RY HR GFF A IVLI LLCISAL LYNIFHWNPQVYK IS GWVVLIACVV VGL AL HR HR AFT A ISTA LLSISSI VYNTIKWNPRIVS LS GVVVFAVVI VSL SV HY DR GWL A IVVL LLSIGII LYNIRWNPRVCL LS GVVVFAVVI VSL SV HY DR GWL A IVLL FLIASI MYNWKHDTSVLK FS DVVVVAVII IGL SM HY DK GWL A IVLL FLIGTI ALNIHKYNSSVK YN PVVEALSAAI IGL LL KY SK SFI S IMAA TFTTPII LYSIVHYYPGIFK IS	283 283 280 282 287 258 253 251 255 245 284 274 266
CcHAK1	EKTLINYFORNGREGUISIOCVF CIRCSEAMFAOLGHESVRSIQISESCLVFPALLSAX	343
CaHAK1	PKLINYFQRNGKKGIS VFCI SKAMF MG SVRSIQIS SCLVFPALLSA	343
LeHAK5	RM IIHYFKRNGKKG ISINEVFICIDES AMFALLGHESVRSIQIS SCLVF ALLSAS	340
AtHAK5	LLIIYYFRRTGRQGHISLGGWFECILGT AMFRIDGHESVRAVQIS SCVAY ALVTI	342
ThHAK5	LEIIHYFRRNGKKGIISLGGVFFCIIGTTAMFALIGHSVRAVQISTSCIAY ALVTI	347
OsHAK1	W IVQYFRRNGKKGIVSLGGVVICVET GMFADIGENIRAVQIS NCILFISVALC	378
HVHAKI	MIVQYFIRNGKSGVSLGGIILCVTTTGMFINIGTNIRAVQLSINGILFSVALC	333
MCHAKI	Y MYKFLKKTORGG MSING ILLCMT, SKAMFLEGTSOSSIKIATSFVVY ALILA	311
MCHAK2	T MIKELKKTELSGEMS VLLCITE SEAMF MEGH SYMAIQIA TELVY TLLLA	315
ACKTI	V MIKFLKSTGVEG VSICH VVISI VKTMFRAGE SSLSIKVA SFFVY CLILAR	305
HVHAK2	THE TYPE FRITCH DE TOUR THE	344
ACHARI Ocharia	VIIIAITARGGRUKATS THE STER TALL AND AND AN AND AND	334
OSHAR12	TURET DNKPOCIOL CTURET AD IN CORRECT OF A CONTRACT OF A CO	326
USAAKI /	* ** ** * * *** * *** * *** * **** ** *	520

-

# CAPÍTULO II

ь

CcHAK1 CaHAK1 LeHAK5 AtHAK5 OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK17	SGQAYLSKFPERVSNTEXDSVDDPLYTETFVV VAAAIIAS AMISGTFSIVAQAQ SGQAYLSKFPERVSNTEXDSVDDPLYTETFVV VAAAIIAS AMISGTFSIVAQAQ SGQAYLTKFPERVANTEXDSIDDPLYTETFVV VAAAIIAS AMISGTFSIVAQAQ CGQAYLTKHTYNVSNTEXDSIDDPLYTETFVV VAAAIIAS AMISGAFSVISQSL CGQAYLTKHTSNVSNTEXDSIDDPFYTETFVV VAASIIAS AMISGAFSVISQSL IGQAYLTKHTSNVSNTEXDSIDDPFYTETFVV VAASIIAS AMISGAFSVISQSL IGQAYLRKFPERVSDTEXTSIDDFFYTETFVV VAASIIAS AMISGAFSVISQSL IGQAYLRKFPERVSDTEXTSIDDFFYTETFVV VAASIIAS AMISGAFSVISQSL IGQAYLRKFPERVSDTEXTSIDDFFYTETFVV VAASIIAS AMISGAFSVISQSL IGQAYLSKHHSLQSGYRVG VSVEKIR VLAITILAAIVG AVITGTFSIIKQCS MGQAYLSKHHENAAGISILSVEKVKVVFMVIL SVVGS AVISGTFSIINQSQ MEEVAFLSKHHEDIQOSTKAIEPPVFTVFIV TEAVVGS AVISATFSIISQCC MGQAFLSKHMDAVHDSTLSI RTVFTMFVLSLAIVGS STISATFSIVKQCL SSQAYIRRYPDHVADAFRSIGSVYVMFIITAAAIVAS ATISATFSLVQAL TQAYISNKDHVVDAFRSIDDTIY VFIITAAAIVAS ATISATFSLVQAL	400 400 397 399 404 375 390 371 368 372 362 401 391 383
	*:.*:: ** :* : ** : :* *:::.**: ::.::::::::	
CCHAK1 CaHAK1 LEHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OSHAK1	SIGCFTRVKVVHTSPKHGSQVYIPELNYFLMIACVIVILSFKTTEKLGHAYSIAVVSAEI SIGCFTRVKVVHTSPKHGSQVYIPELNYFLMIACVIVILSFKTTEKLGHAYSIAVVSAEI NVGCFFPVKVHTSTKHDGQVIPELNYFLMIACVLVTLSFKTTEKLGHAYGIAVVSAEI RMGCFFPVKVVTSAKYEGQVIPELNYFLMLACIAVTLAFRTTEKIGHAYGIAVVTVMV RMGCFFPVKVVTSAKYEGQVIPELNYFLMLACVAVTLTFRTTEKIGHAYGIAVVTVMV SLGCLFFVRVIFTSKKYEGQVIPEVFMMGLASIIVTIAFRTTTSINNYGICVVTTFM	460 460 457 459 464 435
HVHAK1	SLGCMPRVRVIHTSHKYE QV I EVN FLMGLASIV TVAFRTTTSIGH YGICVVTTFA	450
MCHAK1 MCHAK2	SLGCFPFVKVVHTSDKIHGOI IPEINWILMILCIAUTIGFRDTKHIGN SGLAVMTVML	428
AtKT1	ALDCFPEVKIIITSSKIHGQI IPEV WMLMCLCLA TIGLRDTNMM HAY LAVTSVML	432
HvHAK2	SLGCFFFWKVVHT RWIY QITIPEIWWILMCLCLAFTIGFRDINII NAY LVCITVMF	422
AtHAK11	AHGCFPRVKVVHICRKFLQIVVPDIWILMILCIA TAGFKNQSQICN Y TAVVIVML	461
OsHAK12	ALGCFFRVSVVHTSKKFLGQIMIPDINWVLMILCIAVTAGFKNQSQIGNAYTAVVIVML	451
OsHAK17	VLDYFPRVKVVHIQHKEEEVISEINYILMVLCVGVILGFGGGKAINNFVVVIMVML	443
	· **** ::*** *::* *::*: · · · * · · · ·	
CCHAK1	THE HMUTIUMI.VIEKTRIWWITT.FYGTYLFISSTERSAOLTEFTOGGYLEIAFSVVLVII	520
CaHAK1	TETHNUTLUMI.VTWKTRTWWITLFYGTYLFIEST FSAOLT FTOGGYLFIAFSVVLVII	520
LeHAK5	TTTHMVTLVMLVTKKKKKKWWTTLFYAVYLSTEST FSAOLT FTO GYLMAFSVVLVII	517
At HAK5	TERLMUTT.TMI.VTEKTNIUWIAIFI.VVFGSIEMI.T.SSVMYEFTS GYLELTITAM	515
THAKS	TEREMUTI THINTEKTNING AMELIGEGSTEMI. I.SSVMY FTS GYL LATTINIAM	524
OsHAK1	VI HIMTUVMI.I.TEKKHI.VETI.I.FYCVEGETEVVII.SSTI.S.FVDGYL FCEAMVI.MTM	495
HTHAR1	TT HIMTVWILLTEKKHUMETMI.FYUVEGSTELTU.SSTMS FTE-GYLTCFALVUMSI.	510
MCHAK1	VI CIMCIUMULCIKKSUFI ALCET FFECSTEAL FEASULUAI.SET MUTU	491
MCHAK2	VI CIMBLYMVICHKOVEDRIGHTFFGSTERIFFSSILTEDBAWVVVRISHTMIV	488
A+KT1	VICLMTLUMTIVEKORITTVLAFUVEGSILLIVESSOVV VPEGWITILSLTEMAV	492
HTHAK2	VTWIMALVITEVWKKNIMIALLELTEEGST GATLSASET VPO GWTETALAEVEMET	482
ATHAK1	V TILMTITUTUWECHWULULTETULSLUVECT FSAMLET TOO GWUHLUTAAAFILT	521
OsHAK12	VT FIMVPIMILVEKSHWILVVIFIVISLMVELPFTACINKVDO GWVELVVATTCFII	511
OsHAK17	I VLLTLVMIII RTPLVLAGLYFVPFFIM GAIVSAVFT IPE GWL FAVSITLAMI	503
	1** 11 11 . *1 1 1 * *.11 . **. * 1 1	
CcHAK1	GT HYVOKLRYOFELSNKVS-SEYIRDLANNPDIKEVREIGLLYSELVOEIPPIF	575
CaHAK1	MGT HYVOKLRYOFELSNKVS-SEYIRDLANNPDIKAVR IGLLYSELVOCIPPIF	575
LeHAK5	MGT.YYVOKLRYEFELNNKVS-TEYISDLANNPDIKKVP IGLLYSELVOCIPPIF	572
AtHAK5	MAI QYVHVLKYRYELREKIS-RENAIQMATSPDVN VP IGLFYTELVVLMVN ITPLF	574
ThHAK5	MAINQYVHVLKYRYELREKIS-GENAIQMATSPNVN VP IALFYTELVH ITPLF	579
OsHAK1	MATWHYVHVRRYWYELDHIVPTAELASLLEENGGVR VPOVGLLYTELVO IPPLF	551
HVHAK1	MAAMHYVQVRRYWYELDHIVPISEMTMLLEKNE-VREIPVGLLYTELVQEIPPVF	565
MCHAK1	YV HYGTQKKYEFDVQNKVP-INWLLDLSPNLGIV VR IGLIQTELVA IPAIF	546
MCHAK2	MLV HYATIKKYEFDLHNKVS-LEWLLALGPSLGISKVPEIGLVFTDLTSEIPANF	543
AtKT1	YINNYGTTKKHEFDVENKVS-MDRIVSLGPSIGMVKVPBIGLVYSNLVTVPAVF	547
HvHAK2	MYV HYGTRRKYLFDLQNKVS-MKWILTLGPSLGIV VP IGLIYTELVT VPAIF	537
AtHAK11	MWV HYGTLKRYEFEMHCRVS-MAWILGLGPSLGLV VP VGLVYTELAS VPHIF	576
OsHAK12	MYV HFCTVKRYEFEMHSKVS-MAWILGLGPSLGLV VP IGFVYTELAS VPHIF	566
OsHAK17	FGWYYGRQRKFEYEMTNKVS-LEHLGELLARPEVQWVPWLCFFYSNIQDWLTPIL	558
	<b>* * : :::: : : *: *: ::: *:</b> *:. :	

CcHAK1	HHFVSNIPSV SVIVLVSIKSIPISK ALQEEFLFRHVE REYKVFRCVVRL KDQL	633
CaHAK1	HHFVSNIPSV SVIVLVSIKSIPISK ALQE FLFRHVE REYKVFRCVVRL KDQL	633
LeHAK5	PHFVSNIPSVISVIVLVSIKSIPISK ALOE FLFRHVE REYKVFRCVVRL KDOL	630
A+HAK5	SHYTSNISSU SVEVIJSTKTLDUND TSSE FFFDYVC KDSCMFRCVVRY KEDI	632
mb us vE		637
THRAKS	SHIISNLSSV SVFVLISIKSLFVSR TPSE FFFRIME KDCGMFRCVVRI KEDI	037
OsHAK1	PRLVRKIPSV AVFVFISIKHLPIPH AAAE FLFRQVG RARRVFRCVARY TDAL	609
HvHAK1	PRLIQKIPSV SIFIFMSIKHLPISR VPTE FIFRQVG REHRMFRCVARY SDTL	623
MCHAK1	SHFYTNLPAF OVLVFLCVKSVPVPH KSEE FLVGRIG REFRIYRCIARY RDNH	604
MCHAK2	SPEVENT PAR KULVEVCVKSVPVPY PPAR YLVGBUC STHRSYRCTVRY BDVH	601
ALEM1		605
ALKII	GHFVINLPAF KILVFVCVKSVQVPI GEEEFVISKVG KEIGHFKSVVKI KDVF-	605
HVHAK2	SHFVTNLPAF QILVFVCVKSVPVPY PADE YLIGRIG RQYRMYRCIVRY KDVQ	595
AtHAK11	SHFITNLPAI SVVVFVCVKNLPVYT PEEE FLVKRIG KNFHMFRCVARY RDLH	634
OsHAK12	SHFITNLPAI SVVVFVCVKYLPVYT PTEE FIVKRIG KNFHMFRCVARY KDIH	624
OsHAK17	SHYIKNMSSL TVTIFVTLRSLLVAK DOSK ILINRLG NGVYGCTVOY ADNLSL	616
	~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~	
CCHAK1	GOTAN FENOLVEOLNKET RHEHYTLAAOFOVLADRETE PASCOLVECESSKUHTEED	690
Callar1	OPENNENOT WEDT NUETDIEUVIT N OPONT NEEDDA GOOT WEDT GOOD AT THE PROPERTY OF A CONTRACT OF A CONT	600
Canaki	GUIAMEENQLVEQUNKEIKHEHIILAAQEQVLARKETEPASGQLVPGRSSKVHIEED	090
LeHAK5	GDTMDFENQLVEQLNKFIRHEHYILEAHEQVVNREKTSRVHIEEE	675
AtHAK5	EEPDEFERHFVYYLKEFIHHEHFMSGGGGEVDETDKEEEPNAETT	677
ThHAK5	EEPDEFEROFVHYLKEFIHHEYFISGGGGDVEETTDKEEEPNIETT	683
OsHAK1	EEPREFAAFLVDGLKMFIOEESAFAPHOEMIDAAADDDDDEA	650
U	PERFERENT UNDER WETOPERS FAT UODOPECCCACDUSDA	665
Mounei		652
MCHAKI	KDEFEFEKDLVCSIAEFIKSEKPENKNAPENEDIDEENLTVVG-SFSTN	632
MCHAK2	QDVDSFESELVAKLEAF IRYDWTRGAHGADPSSNEHDDAHSSGSNECRLSVIGNIRFSHE	661
AtKT1	REMYDFESRLVSAIVEFVGTE	626
HvHAK2	KDDENFENHLVMSIAKFIQMEAEEAASSGSYESSNEGRMAVIHTTDATGTGLVMRDSN	653
AtHAK11	KKDDDFEKRLFESLFLYVRLESMMEGGCSDSDDYSICGSOQOLKDTL	681
OSHAK12	KEDDDFEKMLUDBLULFVBLESMMDDYSDSEDFTMMEEKTOGSSNALL	672
Ocupr17		643
USHARI /	EGGDDHARQVISCLQWIIQRDIDGRAS	045
a		727
CCHARI	LQQQVDSRISTSTRS HSVHTPTAQSNRSSSRTQMVPPNASGQEEMQ	131
CaHAK1	LQQQVDSRISTSTRSIOSVHTPTAQSNRSSSRTQMVPPNASGQEEMQ	137
LeHAK5	MEQPQQQQQVDSTTSPSTRSIQSNRSSSRIQVLHPNASGQEETQ	719
AtHAK5	VVPSSNYVPSSGRIGSAHSSSSDKIRSGRVVQVQSVEDQTE	718
ThHAK5	LVPMSNSVASSGRVGSTH8SS-NKIRSGRVVOVOYVEDHKD	723
OGHAKI	AARPRRSTSSAVHSEEATOAASSGRTTASSVOLOAGGEPPAAMDVEEEKR	700
Oshaki	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR	700
OSHAKI HVHAK1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ	700 708
Oshaki Hvhaki Mchaki	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ	700 708 705
Oshaki Hvhaki Mchaki Mchak2	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE	700 708 705 721
OsHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEEKEECM	700 708 705 721 645
OsHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEKBECM EGTSLTRSSKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRVRF0IAEEEQVNPOVRDELS	700 708 705 721 645 705
OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQWQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEE	700 708 705 721 645 705 725
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEESKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRVRFQIAEEEQVNPQVRDELS GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE	700 708 705 721 645 705 725 725
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK12	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEEMSSVRK	700 708 705 721 645 705 725 725 721
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK17	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQWQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEKEECM EGTSLTRSSKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRVRFQIAEEEQVNPQVRDELS GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQTFGDELE	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649
OSHAKI HvHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK17	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEMSSVRK	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK17	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEMSSVRK	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK17 CcHAK1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQWQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEE	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649
OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK17 CcHAK1 CaHAK1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGTSLTRSSKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRVRFQIAEEEQVNPQVRDELS GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQTFGDELE :. FVEKAKEQ VFYLLAEAEVVAKKDSSFVKKAFVNYGYN LRKNFRQGEKVMAIQ	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649 792 792
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1 OSHAK12 OSHAK17 CcHAK1 CaHAK1 LeHAK5	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVPETPQIDNQWQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGLEEEKAECQ GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQTFGDELE KAECQ VFYLLAEAEVVAKKDSSFVKKAFVNYGYN LRKNFRQGEKVMAIQ FIEKAKCQ VFYLLAEAEVVAKKDSSFVKKAFVNYGYN LRKNFRQGEKVMAIQ	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649 792 792 792 792
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CaHAK1 LeHAK5 AtHAK5	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQWQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRVVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE PGLEEEKEECM EGTSLTRSKKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRVRFQIAEEEQVNPQVRDELS GNONENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQT	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649 792 792 792 774 773
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CAHAK1 LeHAK5 AtHAK5 TbHAK5	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEBEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE FGLEEEMSSVRK	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649 792 792 792 774 773 778
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1 OSHAK12 OSHAK17 CcHAK1 CaHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 CoHAK1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE EGTSLTRSSKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRVRFQIAEEEQVNPQVRDELS GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQTFGDELE 	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649 792 792 774 773 778 755
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1 OSHAK12 OSHAK17 CcHAK1 CaHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OSHAK1 USHAK1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQWQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGLEEE	700 708 705 721 645 705 725 725 725 725 725 725 722 792 792 774 773 778 755
OSHAKI HvHAKI McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CAHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OSHAK1 HvHAK1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQWQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGISEEE	700 708 705 721 645 705 725 725 725 721 649 792 792 774 773 778 755 763
OSHAK1 HvHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CaHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OSHAK1 HvHAK1 McHAK1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEBEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGTSLTRSSKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRVRFQIAEEQVNPQVRDELS GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQT	700 708 705 721 645 705 725 721 649 792 774 773 778 755 763 760
OSHAKI HvHAKI McHAKI McHAK2 AtKTI HvHAK2 AtHAK1 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CAHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGTSLTRSSKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRRVRFQIAEEEQVNPQVRDELS GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQTFGDELE 	700 708 705 721 645 725 725 725 721 649 792 774 773 778 755 763 760 776
OSHAKI HvHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CAHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQWQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGISEEENSSVRK	700 708 705 721 645 725 721 649 792 774 773 778 755 763 776 700
OSHAK1 HvHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CAHAK1 LeHAK5 THHAK5 THAK5 OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGISEEE	700 708 705 721 645 705 725 721 649 792 792 774 773 778 755 763 766 776 700 760
OSHAK1 HvHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CaHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEBEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGTSLTRSSKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRVRFQIAEEEQVNPQVRDELS GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQTFGDELE 	700 708 705 721 645 705 725 725 721 649 792 772 772 772 773 778 755 763 760 776 7760 7760 780
OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CAHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtKT1 CHAK12 OSHAK12 OSHAK1 CHAK2 AtKT1 CHAK12 OSHAK1 CHAK2 AtK12 CHAK1 CHAK2 COSHAK1 COSHA	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGISLTRSSKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRRVRFQIAEEEQVNPQVRDELS GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQT	700 708 705 721 645 725 725 725 721 649 792 774 773 778 753 760 776 700 760 780
OSHAKI HvHAK1 McHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK1 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CAHAK1 LeHAK5 AtHAK5 ThHAK5 OSHAK1 HvHAK1 McHAK1 McHAK1 McHAK1 HvHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK12 OSHAK12 OSHAK12 OSHAK12 OSHAK12 OSHAK12 OSHAK12 OSHAK12	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQWQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGLEEE	700 708 705 721 645 725 721 649 792 774 773 778 755 763 776 776 770 776 760 780 780 703
OSHAK1 HvHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtHAK11 OSHAK12 OSHAK12 OSHAK17 CCHAK1 CAHAK1 LeHAK5 THHAK5 THHAK5 OSHAK1 HvHAK1 McHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtKT1 HvHAK2 AtKX11 OSHAK12 OSHAK17	AARPRRSTSSAVHSEEAIQAASSGRTTASSVQLQAGGEPPAAMDVEEEKR LARPRRSTVHSEEAVQGQARVSSHSASGRMSFHTSQAVEEEKQ KGVKLSEDEMDSTEIVGTSELQKVNSLDKPKKRVRFVVPETPQIDNQMQEELQ PPYEMDENPQPASVSIGLPSVESVTDIMEMGPIKRRVRFADDDEVSGGNEKEVGMRQELE GGTSLTRSKKSGTLQSLQSIYEQESGSLSRRRVRFQIAEEQVNPQVRDELS GNGNENENLATFDTFDSIESITPVKRVSNTVTASSQMSGVDELE LTGKAGSNTMCSTGDLSYSSQDSIVPAKSPIRGNSLTRYSSQT	700 708 705 721 645 705 725 721 649 792 772 778 755 763 760 7760 760 780 780 703

CcHAK1	TRLLRVGMTYEV-	804
CaHAK1	TRLLRV <b>G</b> MTYEV-	804
LeHAK5	TRLLRV <b>GM</b> TYEL-	786
AtHAK5	SKLLKV <b>G</b> MTYEL-	785
ThHAK5	SKLLKV <b>GM</b> TYEL-	790
OsHAK1	DQLLKVGITYEI-	767
HvHAK1	DQLLKV <b>G</b> ITYEI-	775
McHAK1	ASTLEVGMVYHV-	772
McHAK2	VSLLEV <b>GM</b> VYVV-	788
AtKT1	TSLLEV <b>G</b> MVYYVF	713
HvHAK2	ISLIEV <b>G</b> MIYYV-	772
AtHAK11	ESLLNV <b>G</b> QIFYV-	792
OsHAK12	ESLLNV <b>G</b> QIYYI-	792
OsHAK17	QQRVEI <b>GM</b> LYKV-	715
	:.:* : :	

Figura 2.5 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de algunos transportadores de tipo HAK. En gris se muestran los aminoácidos conservados entre las secuencias, diferencias entre CcHAK1 y CaHAK1 (recuadros), secuencia conservada en el primer segmento transmembranal (delineado) y diferencia en la posición 356 entre los transportadores del grupo I (recuadro punteado); Clustal W2 (http://www.ebi.ac.uk/Tool/ clustalw2/index.html). Secuencias: *C. chinense* CcHAK1; *O. sativa* OsHAK1 (AJ427970) y OsHAK17 (AJ427975.1), OsHAK12 (AJ427981.1); *H. vulgare* HvHAK1 (AF025292) y HvHAK2 (AF129479.1); *A. thaliana* AtHAK1 (BT002147.1), AtHAK5 (AF129478.1) y AtKT1 (AF012656.1); *T. halophila* ThHAK5 (EF177193); *M. crystallinum* McHAK1 (AF367864.1) y McHAK2 (AF367865.1); *C. annuum* CaHAK1 (AY560009); *L. esculentum* LeHAK5 (DQ489721).

El análisis filogenético ubica a CcHAK1 en el grupo I de los transportadores de K<sup>+</sup>, cerca de CaHAK1 y SIHAK5 (Figura 2.6). En este grupo se encuentran los transportadores que presentan características como una alta afinidad a K<sup>+</sup>, sensibilidad a Na<sup>+</sup>, pobre discriminación entre K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>, así como una expresión inducida en condiciones de ausencia de K<sup>+</sup> (Alemán *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2000).

2.9.4 DESCREPCIFIEDELA PROTEINA COMAN

CcHAK1: 0.00551 CaHAK1: 0.00444 LeHAK5: 0.07169 AtHAK5: 0.04850 **GRUPO I** - ThHAK5: 0.05086 -OsHAK1: 0.09774 -HMHAK1: 0.10826 -0sHAK17: 0.33159 - GRUPO IV AtHAK11: 0.14760 **GRUPO III** OsHAK12: 0,15922 HMHAK2: 0.21327 MCHAK1: 0.18727 **GRUPO II** McHAK2: 0.18190 AtKT1: 0.21150

Figura 2.6 Árbol filogenético de la familia de transportadores KT/HAK/KUP. Se muestran algunos de los miembros más representativos de cada grupo y a CcHAK1 en recuadro. Número de accesión: OsHAK1(AJ427970), HvHAK1 (AF025292), HvHAK2 (AF129479.1), AtHAK1 (BT002147.1), AtHAK5 (AF129478.1), ThHAK5 (EF177193), McHAK1 (AF367864.1), McHAK2 (AF367865.1), CaHAK1 (AY560009), LeHAK5 (DQ489721), OsHAK17 (AJ427975.1), OsHAK12 (AJ427981.1), AtKT1 (AF012656.1).

Figure 2.1 Perforde Haroldon and Dr CHART Productor of the 12 reginery montation which reduite in projection Transmospheres in his wide the trademissional

## 2.9.4 DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA CCHAK1

#### 2.9.4.1 PERFIL DE HIDROFOBICIDAD DE CCHAK1

Los análisis *in silico* de la secuencia obtenida del ADNc total de CcHAK1 revelaron que CcHAK1 codifica a una proteína de 804 aminoácidos, con una masa molecular de 89.86 KDa y un punto isoeléctrico (pl) de 9.03. Mediante los programas TopPred, Tmpred y TMHMM se obtuvo el perfil de hidrofobicidad de CcHAK1 el cual predice la presencia de: 12 regiones transmembranales y un extremo carboxilo-terminal largo (278 aa) característico (Figura 2.7). En la Figura 2.8, se muestran los límites para cada dominio predichos mediante los tres programas.



**Figura 2.7** Perfil de hidrofobicidad de CcHAK1. Predicción de los 12 segmentos transmembranales mediante el programa TopPred (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal. py?form=toppred).
ASSDSDHHTDQEIVNGGQLKDRKVSWAKLARVDSLNLEAGKVSSTPENHNSTADWKTVLSLAFQSVGVIYGDIGTSPLYVFASTFTD KIGHKDDILGVLSLIIYTIILVPMTKYVFIVLWANNNGDGGAFALYSLLCRYAKVSLIPNQEPEDRELSHYSLDIPSNHIRRAQRIRH SLEKSKFAKIFLVFLAILGTSMVIGDGVLTPCISVLSAVSGIKPLGQEAVVGISVAILIALFCAQRFGTDKVGYTFAPAICIWFMFIS GIGLYNLFKYDVSVLRAFNPKYLINYFQRNGRKGWISLGGVFLCITGSEAMFADLGHFSVRSIQISFSCLVFPALLSAYSGQAAYLSK FPETVSNTFYDSVPDFLWPTFVVAVAAAIIASQAMISGTFSIVAQAQSIGCFPRVKVHTSPKHGGQVYIPELNYFLMIACVIVLS FKTTEKLGHAYGIAVVSABIITTHMVTLVMLVIWKTRIWWITLFYGTYLFISSYFSAQLTKFTQGGYLPIAFSVVLVIIMGTWHYQ KLRYQFELSNKVSSEYIRDLANNPDIKRVRGIGLLYSELVQGIPPIFHHFVSNIPSVHSVIVLVSIKSIPISKVALQERFLFRHVEPR EYKVFRCVVRLGYKDQLGDTANFENQLVEQLNKFIRHEHYILAAQEQVLADRETEPASGQLVPGRSSKVHIEEDLQQQVDSRISTSTR SIHSVHTPTAQSNRSSSRTQMVPPNASGQEEMQFVEKAKEQGVFYLLAEAEVVAKKDSSFVKKAFVNYGYNFLRKNFRQGEKVMAIPQ

PROGRAMA	1	11	101	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
TopPred	67-87	95-115	183-203	221-241	248-268	297-317	326-346	369-389	424-444	456-476	506-526	574-594
TMpred	56-83	95-120	183-201	220-240	252-272	298-317	327-347	369-389	426-444	447-474	508-524	578-594
TMHMM	62-84	97-119	186-205	226-245	250-272	298-317	327-349	369-391	421-440	452-474	478-500	507-526

Figura 2.8 Predicción de los límites de los segmentos transmembranales de CcHAK1. Programas utilizados: TopPred (http://mobyle.pasteur.fr/cgibin/potal.py?Form=toppred), TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMP RED\_form.html), TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMMM/). Sombreado en gris se limitan los 12 segmento transmembranales determinados con el programa TopPred. En delineado se marca la secuencia conservada en el primer segmento transmembranal.

#### 2.9.4.2 PERFIL DE FOSFORILACIÓN DE CCHAK1

La fosforilación es el tipo de modificación postraduccional más frecuente en las células eucarióticas. Se caracteriza por ser reversible y específica de residuo, participando en el control de numerosos procesos. Por medio de este mecanismo las proteínas pueden regular su actividad. Los aminoácidos que pueden fosforilarse son: serina (S), treonina (T) y tirosina (Y). Al realizarse el perfil de fosforilación de CcHAK1 se determinó que la probabilidad de fosforilación de la proteína es alta; siendo de 28 serinas, seis treoninas y ocho tirosinas, estas con valores superiores a 0.5 (score) (Figura 2.9).

MASSDSDHHTDQEIVNGGQLKDRKVSWAKLARVDSLNLEAGKVSSTPENHNSTADWKTVLSLAFQSVGVIYGDIGTSPLYVFASTFTDKIGH KDDILGVLSLIIYTIILVPMTKYVFIVLWANNNGDGGAFALYSLLCRYAKVSLIPNQEPEDRELSHYSLDIPSNHIRRAQRIRHSLEKSKFA KIFLVFLAILGTSMVIGDGVLTPCISVLSAVSGIKPLGQEAVVGISVAILIALFCAQRFGTDKVGYTFAPAICIWFMFISGIGLYNLFKYDV SVLRAFNPKYLINYFQRNGRKGWISLGGVFLCITGSEAMFADLGHFSVRSIQISFSCLVFPALLSAYSGQAAYLSKFPETVSNTFYDSVPDP LYWPTFVVAVAAAIIASQAMISGTFSIVAQAQSIGCFPRVKVVHTSPKHGGQVYIPELNYFLMIACVIVILSFKTTEKLGHAYGIAVVSAEI ITTHMVTLVMLVIWKTRIWWITLFYGTYLFIESTYFSAQLTKFTQGGYLPIAFSVVLVIIMGTWHYVQKLRYQFELSNKVSSEYIRDLANNP DIKRVRGIGLLYSELVQGIPPIFHHFVSNIPSVHSVIVLVSIKSIPISKVALQERFLFRHVEPREYKVFRCVVRLGYKDQLGDTANFENQLV EQLNKFIRHEHYILAAQEQVLADRETEPASGQLVPGRSSKVHIEEDLQQQVDSRISTSTRSIHSVHTPTAQSNRSSSRTQMVPPNASGQEEM QFVEKAKEQGVFYLLAEAEVVAKKDSSFVKKAFVNYGYNFLRKNFRQGEKVMAIPQTRLLRVGMTYEV





La regulación de las actividades de canales y transportadores de K<sup>+</sup> mediante modificaciones postraduccionales juegan un papel crucial en la traducción de la señal en respuesta a deficiencia de K<sup>+</sup>. Para el caso de los canales se ha demostrado que AKT1, puede funcionar en el rango de alta y baja afinidad. Se ha sugerido que un cambio entre estos dos mecanismos de toma de K<sup>+</sup> pueden ser controlados por el estado de fosforilación de AKT1 (Wang y Wu, 2010; Xu *et al.*, 2006). Para el caso de transportadores es muy poco lo que se sabe, pero no se destaca la posibilidad de una regulación mediante fosforilación.

#### 2.9.5 EXPRESIÓN DE CCHAK1

Para determinar las condiciones en las que se expresa CcHAK1, se realizó un PCR semicuantitativo (Figura 2.10). Las plántulas fueron crecidas en solución Hoagland (1.4 mM K<sup>+</sup>), posteriormente fueron ayunadas en solución Hoagland sin K<sup>+</sup> durante 10 días.

La expresión de CcHAK1 en plántulas ayunadas de K<sup>+</sup> fue mayor en comparación con las que estuvieron en presencia de él, esto comprueba que la ausencia de K<sup>+</sup> induce un aumento en la expresión de CcHAK1. Esta expresión no se ve afectada en presencia de 10 mM de NaCl.



La expresión del ARN ribosomal 18S fue analizada como control de carga.

**Figura 2.10** Expresión de CcHAK1 en raíces de plántulas de *C. chinense* (Jacq.) crecidas en diferentes condiciones durante 10 días. Las plántulas fueron mantenidas en solución Hoagland en presencia (1.4 mM K<sup>+</sup>), en ausencia de K<sup>+</sup> o en ausencia de K<sup>+</sup> suplementado con 10 mM NaCl, durante 10 días. Gel teñido con bromuro de etidio A) CcHAK1; C) ARN usado para la síntesis del ADNc y C) ARN ribosomal 18S como control de carga.

## 2.10 DISCUSIÓN

Los transportadores pertenecientes a la familia HAK/KUP/KT, están claramente implicados en el transporte de K<sup>+</sup>. Estos transportadores fueron inicialmente descubiertos en hongos (Bañuelos et al., 1995). Posteriormente fueron identificados en cebada (*H. vulgare*; Santa-María *et al.*, 1997) y desde entonces han sido identificados en numerosas especies (Véry y Sentenac, 2003), habiéndose observado la existencia de varios genes por especie (Rubio *et al.*, 2000; Bañuelos *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2004) (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.5 Transportadores de alta afinidad a K<sup>\*</sup> que han sido clonados en diferentes especies de plantas. \*Organismo en el que se ha realizado la caracterización funcional.

ORIGEN	NOMBRE	ORGANISMO	CEPA	CITA
Aleuropus littoralis	AIHAK	S. cerevisiae	WA3	Su et al., 2007
Phragmites australis	PhaHAK2	S. cerevisiae	9.3	Takahashi et al., 2007
Vitis vinifera	VvKUP1 VvKUP2	E. coli	TK2420	Davies et al., 2006
Capsicum annuum	CaHAK1	S. cerevisiae	W∆3	Martínez-Cordero et al., 2004.
Cymodocea nodosa	CnHAK1 CnHAK2	S. cerevisiae E. coli	W∆3 TKW4205	Garciadeblas <i>et al.</i> , 2002
Arabidopsis	AtHAK5; AtHAK6 AtKT1/AtKUP1 AtKT2/AtKUP2	S. cerevisiae	WA3	Rubio <i>et al</i> ., 2000
Neurospora crassa	NcHAK1	S. cerevisiae	WA3	Haro <i>et al.</i> , 1999
Hordeum vulgare	HvHAK1	S. cerevisiae	W∆3	Santa-María et al., 1997

Para el caso del género *Capsicum* sólo se ha identificado un transportador tipo HAK1 en *C. annuum*, por lo que este trabajo resulta relevante debido a la contribución al conocimiento de los transportadores de alta afinidad de  $K^+$  en otras especies de éste

género y así poder determinar el mecanismo de transporte de K<sup>+</sup> en *C. chinense* Jacq; cuyas características del suelo donde se cultivan muestran una baja concentración en el K<sup>+</sup> disponible para la planta, por lo que se hace necesario dilucidar cuál es el mecanismo de toma de K<sup>+</sup> bajo estas condiciones.

Como parte de un todo en el estudio de este sistema de transporte, en este trabajo, se aisló el ADNc de CcHAK1 a partir de ARN de plántulas cultivadas en ausencia de K<sup>+</sup>. El tamaño del ADNc aislado fue de 2416 pb y se comprobó su identidad con el programa BLASTx, CcHAK1 arrojo una identidad del 99% con el transportador de alta afinidad CaHAK1 y un 84% con el de SIHAK5. La traducción de la proteína mostró que codifica a un polipéptido de 804 aminoácidos y de 89.86 KDa (Clustal W2). Además, esta proteína mostró las regiones conservadas presentes en algunos de los transportadores de la familia HAK/KT/KUP (Figura 2.5) y los 12 segmentos transmembranales característicos (Figura 2.6 y 2.7).

Entre los transportadores de alta afinidad a K<sup>+</sup> que se han reportado se encuentra el de cebada (*H. vulgare*), HvHAK1. El ADNc contiene un marco de lectura abierto de 2319 pb, el cual codifica para un polipéptido de 86.2 KDa y 773 aminoácidos. El análisis de hidrofobicidad describe las 12 regiones transmembranales (Santa-María *et al.*, 1997). Otro transportador clonado es el de pimiento (*C. annuum*), CaHAK1 (Martínez-Cordero *et al.*, 2004). CaHAK1 codifica para una proteína proteína de 804 aminoácidos, la cual presentó al igual que HvHAK1 los 12 segmentos transmembranales. Más tarde, Takahashi *et al* (2007) reportó el ADNc de *P. australis,* con un marco de lectura abierto de 2346 pb que codifica a una proteína de 782 aminoácidos. Por otro lado, Alemán *et al* (2009) clono el ADNc de *Thellungiela halophila*, ThHAK5 que codifica para una proteína de 803 aminoácidos. La proteína mostro las regiones conservadas en los transportadores de la familia KT/HAK/KUP y el estudio de hidrofobicidad revelaron la presencia de los 12 putativos dominios transmembranales. El análisis filogenético asignó a ThHAK5 dentro del grupo I, cerca de AtHAK5 de *Arabidopsis*.

En cuanto a su filogenia, CcHAK1 se ubica dentro del grupo I (Alemán *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2000), muy cerca de CaHAK1. Las características que presentan CcHAK1 y las que podría o no compartir con los transportadores de este grupo se evalúan en el siguiente

capítulo mediante su caracterización funcional. Sin embargo, al hacer el alineamiento con los transportadores pertenecientes al grupo I (Alemán *et al.*, 2009) se encontró que en la posición 356 todos presentan el aminoácido Aspargina (N) y que este aminoácido esta sustituido por Treonina (T) en CcHAK1.

Mediante un RT-PCR semicuatitativo se determinó que CcHAK1 se expresa fuertemente en ausencia de K<sup>+</sup> y que esta expresión no se ve afectada en presencia de NaCl. Estos resultados son comparables con los reportados por Martínez-Cordero *et al.* (2004), el cual mediante un análisis de Northern blot demostró que CaHAK1 se expresa en tejido de raíz de plántulas con tres días de ayuno de K<sup>+</sup> y que esta expresión no se detecta en la parte aérea ni en raíces de plántulas que crecieron en presencia de K<sup>+</sup>. También se ha demostrado que la presencia de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la solución de crecimiento reduce la expresión de CaHAK1 (Martínez-Cordero *et al.*, 2005).

Otro transportador estudiado es el de *Thellungiella halophila*, ThHAK5; cuya expresión fue caracterizada mediante un análisis de Northern blot. Los transcritos de ThHAK5 fueron detectados únicamente en raíces de plántulas en ayuno de K<sup>+</sup>. Este nivel de expresión disminuyó en presencia de NaCl a partir de 25 mM. Para comparar estos resultados con una planta glicófita, ellos utilizaron el transportador de *A. thaliana*; AtHAK5. La expresión de éste al igual que la de ThHAK5, se detectó en raíces de plántulas ayunadas de K<sup>+</sup>, sin embargo la expresión de AtHAK5 se inhibe completamente en presencia de NaCl (Alemán *et al.*, 2009).

La obtención del ADNc que codifica para el transporte de alta afinidad en *C. chinense*, CcHAK1, abre nuevas posibilidades para estudiar el transporte de K<sup>+</sup>; ya que hasta ahora, los estudios de estos transportadores a nivel de proteína son muy escasos por lo que, este trabajo contribuirá a aumentar el conocimiento sobre la familia HAK/KUP/KT.

## 2.11 CONCLUSIONES

- Se aisló el ADNc de CcHAK1 a partir de ARN de raíz de plántulas cultivada en ausencia de K<sup>+</sup>, el cual presenta un tamaño de 2416 pb.
- 2. CcHAK1 arrojo una identidad del 99% con el transportador de alta afinidad de *Capsicum annuum*, CaHAK1 y un 85% con el de *Solanum licopersicum*, SIHAK5.
- El análisis in silico de CcHAK1 mostró que codifica a una proteína de 804 aminoácidos con un peso molecular de 89.86 KDa; y la presencia de los 12 segmentos transmembranales característicos.
- CcHAK1 se induce en ayuno de K<sup>+</sup> y su expresión no se ve afectada en presencia de 10 mM de NaCI, por lo tanto los niveles de transcritos no son regulados bajo estas condiciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahn S. J.; R. Shin; D. P. Schachtman. 2004. Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K<sup>+</sup> uptake. Plant Physiology 134:1135-1145.
- Alemán F.; M. Nieves-Cordones; V. Mártinez; F. Rubio. (2009). Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K<sup>+</sup> transporters of *Theollungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. Environmental and Experimental Botany 65:263-269.
- Bañuelos M. A.; R. D. Klein; S. J. Alexander-Bowman; A. Rodríguez-Navarro. (1995). Apotassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. EMBO J., 14:3021-3027.
- Bañuelos M.A., B. Garciadeblas; B. Cubero; A. Rodríguez-Navarro. 2002. Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. Plant Physiology 130:784-795.
- Clarckson D.T., J.B. Hanson. (1980). The mineral nutrition of higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 31:239-298.
- Fu H.H.; S. Luan. (1998). *AtKUP1*: a dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from *Arabidopsis*. Plant Cell 10:63-73.
- Grabov A. (2007). Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: Single family-multiple functions. Annals of Botany 99:1035-1041.
- Haro R.; L. Sainz; F. Rubio; A. Rodríguez-Navarro. (1999). Cloning of two genes encoding potassium transporters in Neurospora crassa and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology 31(2):511-520.
- Kochian L.V.; W. J. Lucas. (1988). Potassium transport in roots. Adv. Bot. Res. 15:93-178.

Maathuis F. J. M.; D. Sanders. (1992). Plant membrane transport. Curren opinion Cell Biology 4:661:669.

- Rubio F.; G. E. Santa-María; A. Rodríguez-Navarro. (2000). Cloning of arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. Physiol. Plantarum 109:34-43.
- Rodríguez-Navarro A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. Biochem. Biophys. Acta 1469:1-30.
- Santa-María F. E.; F. Rubio; J. Dubcovsky; A. Rodríguez-Navarro. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. Plant Cell 9:2281-2289.
- Su Q.; S. Feng; L. An; G. Zhang. (2007). Cloning and functional expression in Saccharomyces cereviae of a K<sup>+</sup> transporter, AlHAK, from the graminaceous halophyte, *Aeluropus littoralis*. Biotechnology Lett 29:1959-1963.
- Takahashi R.; S. Liu; T. Takano. (2007). Cloning and functional comparison of high-affinity K<sup>+</sup> transporter gene PhaHKT1 of salt-tolerant and salt-sensitive reed plants. Journal of Experimental Botany 58:4387-4395.
- Véry A. A.; H. Sentenac. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. Annu. Rev. Plant Biology 54:575-603.

# PROGRAMAS DE CÓMPUTO OBTENIDOS EN LÍNEA:

Clustal W2 (disponible en Internet, http://www.ebi.ac.uk/Tool/clustalw2/index.html).

TopPrep-Topology prediction of membrane proteín (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/ portal.py?=toppred).

TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\_form.html)

TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHM MM/).

Compute Pi/MW (http://expasy.org/cgi-bin/pi\_tool).

# CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL TRANSPORTADOR CCHAK1

# 3.1 INTRODUCCIÓN

Los miembros de la familia de transportadores KT/HAK/KUP presentan un mecanismo de transporte de alta o de baja afinidad a K<sup>+</sup>, los cuales se han demostrado por medio de la expresión heteróloga en mutantes de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) o de bacterias (*Escherichia coli*) (Rodriguez-Navarro, 2000).

Muchas de las bases del conocimiento sobre los transportadores de membranas en plantas ha sido obtenido por el empleo de levaduras como Saccharomyces cerevisiae y Schizosaccharomyces pombe para su estudio. El progreso en el uso de levaduras como un sistema de expresión heteróloga para transportadores de plantas ha sido facilitado por la manipulación de cepas de levadura con deficiencias específicas en el transporte (Riesmeier *et al.*, 1992; Dreyer *et al.*, 1999). En adición a esto, las levaduras son adecuadas para realizar mediciones del flujo de algunos iones (Dreyer *et al.*, 1999).

En este capítulo se caracterizó funcionalmente un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad CcHAK1, esto mediante estudios de complementación y cinéticas de transporte gracias a su expresión heteróloga en una cepa de *S. cerevisiae* deficiente en éste transporte (W $\Delta$ 3).

#### 3.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La caracterización del transportador CcHAK1 (Figura 3.1), se realizó mediante la complementación con el ADNc total en un sistema heterólogo utilizando la cepa de levadura (*S. cerevisiae*) W $\Delta$ 3, deficiente en el transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad.



Figura 3.1 Estrategia experimental para la caracterización funcional y bioquímica de CcHAK1.

# 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Con el objetivo de caracterizar funcionalmente al transportador CcHAK1, se realizaron experimentos de complementación funcional con una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae*,  $W\Delta3$ , deficiente en los principales sistemas de transporte de K<sup>+</sup>, TRK1 y TRK2. Esta mutante presenta un fenotipo (*Mat a ade2 ura3 trp1 trp1 trk1* $\Delta$ ::*LEU2 trk2* $\Delta$ ::*HIS3*) de no crecimiento en presencia de bajas concentraciones de K<sup>+</sup> (Haro y Rodríguez-Navarro, 2003). También se utilizó la cepa silvestre W303 como control para los ensayos de crecimiento.

La cepa W $\Delta$ 3 fue mantenida en medio YPD y en medio mínimo SD (Sherman, 1991) suplementados con los requerimientos nutricionales correspondientes (Cuadro 3.1) según el marcador auxotrófico y suplementado con 50 mM de K<sup>+</sup>. Para las pruebas de crecimiento y toma de cationes en ausencia de K<sup>+</sup> se utilizó el medio Fosfato de Arginina (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984) (Cuadro 3.2). Para su crecimiento, las levaduras se incubaron a 28 °C.

Cuadro 3.1 Medios utilizados para el cultivo	) de	S.	cerevisiae.
--	------	----	-------------

MEDIO SD (Sherman	, 1991)	MEDIO YPD (Shern	nan, 1991)
Bacto-agar Glucosa Yeast nitrogen base sin aminoácidos (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2% 2% 0.7% 0.5%	Extracto de levadura Peptona Glucosa Bacto-agar	1% (p/v) 2% (p/v) 2% (p/v) 1.5%
REQUERIMIENTOS		les m	
Histidina Adenina Triptófano Leucina	20 mg mL <sup>-1</sup> 20 mg mL <sup>-1</sup> 5 mg mL <sup>-1</sup> 10 mg mL <sup>-1</sup>		

Cuadro 3.2 Composición del medio fosfato de arginina utilizado para el crecimiento y los ensayos de complementación de CcHAK1.

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.2 mM
Arginina	10 mM
*Oligoelementos	1 mL
**Vitaminas	1 mL
Glucosa	2% (p/v)

BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0.8 mM
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> 0	0.016 mM
KI	0.06 mM
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> 0	0.07 mM
MnSO.4H <sub>2</sub> O	0.26 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.08 mM
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.14 mM

#### **\*\*VITAMINAS**

0.8 µM
0.32 µM
0.19 µM
0.12 μM
0.08 µM

El plásmido pCR2.1-TOPO (INVITROGEN) se utilizó de forma rutinaria para la clonación de los fragmentos de PCR. La estirpe de *E. coli* DH5α se usó rutinariamente para la propagación del plásmido cultivándose en medio LB a 37°C. En los experimentos de expresión heteróloga en levaduras, se utilizó el plásmido pYPGE15 (plásmido multicopia de expresión en levadura. Promotor PGK, terminador CYC; Brunelli y Pall, 1993).

# 3.3.2 TRANSFORMACIÓN Y ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL EN GOTAS EN LEVADURA (S. cerevisiae)

El ADNc CcHAK1 fue clonado en el vector de expresión para levadura pYPGE15 (Brunelli y Pal, 1993) y posteriormente transformado en la levadura  $W\Delta 3$  (Haro y Rodriguez-Navarro, 2003). La transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de permeabilización celular con PEG<sub>4000</sub> (Elble, 1992).La cepa transformada con el plásmido pYPGE15 (Brunelli y Pal, 1993) que contenía el ADNc CcHAK1 se designó como W $\Delta 3$ -CcHAK1 y con el plásmido vacío W $\Delta 3$ -p.

Los ensayos de complementación de levaduras deficientes en el sistema de transporte de K<sup>+</sup>, se realizaron en placas Petri con medio fosfato de arginina menos uracilo (FA-U) (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984) (Cuadro 3.2), suplementado con las concentraciones de K<sup>+</sup> establecidas para cada tratamiento (5 mM, 300 y 100  $\mu$ M) y en presencia de 20 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM CsCl y 50 mM NaCl, para los estudios de inhibición. A partir de suspensiones celulares de las levaduras transformadas se realizaron tres diluciones seriadas 1:10. De cada dilución se aplicó 5  $\mu$ L en la placa. Las placas se incubaron durante un periodo de tres a cuatro días a 28°C.

#### 3.3.3 CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS TRANSFORMANTES DE LEVADURA

El análisis de crecimiento de W $\Delta$ 3-CcHAK1 se realizó en medio líquido de FA-U suplementado con diferentes concentraciones de K<sup>+</sup> (5 mM, 500, 300, 100, 50  $\mu$ M). Para las mediciones se utilizó un analizador Bioscreen C Microbiology Reader, que permite la medición simultánea de diferentes curvas de crecimiento. Las densidades ópticas (600 nm) fueron medidas cada tres horas durante tres días consecutivos de crecimiento a 28°C en agitación continua. En este ensayo se utilizó la cepa W $\Delta$ 3 transformada con el HAK1 de *C. annuum* (CaHAK1) (Martínez-Cordero *et al.*, 2004) como un control positivo de crecimiento en rango micromolar.

Para determinar si el sodio en concentraciones milimolares puede inhibir el crecimiento de los transformantes, se utilizó medio FA-U suplementado con 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> y en presencia de

1 y 10 mM de NaCl.

#### 3.3.4 ENSAYOS DE FLUJOS Y ACUMULACIÓN DE CATIONES EN LEVADURA

El análisis de la capacidad de transporte de W $\Delta$ 3-CcHAK1, se realizó mediante dos tipos de ensayos: ensayos de depleción de K<sup>+</sup> del medio y ensayos de acumulación celular del catión. Para ambos ensayos, los cultivos de levadura se crecieron previamente en medio FA-U adicionando 50 mM K<sup>+</sup> durante 12 h, a 28°C en agitación. Posteriormente, el cultivo se colectó por centrifugación (5000 x *g* durante 5 min) y se lavó con H<sub>2</sub>0<sub>mq</sub> para finalmente ser resuspendido y ayunado en medio FA-U en ausencia de K<sup>+</sup> durante 4 h. Una vez ayunado el cultivo fue centrifugado, lavado y resuspendido en tampón 10 mM MES a pH 6 con Ca(OH)<sub>2</sub> suplementado con glucosa al 2%, al cual se le añadió la concentración del catión correspondiente (RbCl y/o KCl).

Los ensayos de entrada de K<sup>+</sup> se realizaron mediante la determinación de la depleción del catión en el medio. A lo largo del tiempo se tomaban muestras de 1 mL del medio externo, se diluían en 1 mL de  $H_20_{mq}$  y a partir de estas diluciones se determinaban los cationes. Para determinar la acumulación del catión se midió el contenido interno del mismo en el cultivo de levadura, tomándose muestras de 5 y 10 mL a distintos tiempos, se filtraban a través de filtros Millipore AAWP (Molsheim, France) de 0.8 µm de poro con ayuda de una bomba de vacío y se lavaban con una solución de 20 mM MgCl<sub>2</sub>. La extracción del catión celular se realizaba con una solución de 0.2 M HCl y 10 mM MgCl<sub>2</sub> durante 12 h.

Para ambos estudios se tomaron muestras del medio de cultivo después del ayuno para comprobar que las levaduras se encontraran ayunadas. Las concentraciones de los cationes se determinaron en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer mod. 2380 (Norwalk, CT, USA). De igual manera se midió la entrada de K<sup>+</sup> en presencia de 1 mM de NH₄CI, CsCI y NaCI, para determinar si la entrada de K<sup>+</sup> puede ser inhibida o disminuida por alguno de estos compuestos.

## 3.4 RESULTADOS

# 3.4.1 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CCHAK1 MEDIANTE ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN EN MUTANTES DE LEVADURA

#### 3.4.1.1 CCHAK1 CODIFICA A UN TRANSPORTADOR DE ALTA AFINIDAD

Para determinar si CcHAK1 transporta K<sup>+</sup>, el ADNc de CcHAK1 fue clonado en el vector de expresión para levadura pYPGE15 y la construcción fue transformada en la cepa de levadura W $\Delta$ 3 deficiente en los sistemas de entrada de K<sup>+</sup> (Haro y Rodríguez-Navarro, 2003).

Como se muestra en la Figura 3.2, la expresión de CcHAK1 permitió recuperar la capacidad de crecimiento del mutante en medios de cultivo a los que se había adicionado, 300 y 100  $\mu$ M de K<sup>+</sup>. Incluso se observó crecimiento cuando los transformantes se inocularon en el mismo medio al que no se había adicionado K<sup>+</sup>, ya que este medio contiene una concentración de K<sup>+</sup> residual de aproximadamente 70  $\mu$ M que aporta el agar utilizado para la solidificación de los mismos. En ninguna de estas condiciones se observó crecimiento del mutante de levadura transformado con el plásmido vacio (W $\Delta$ 3-p). Estos resultados por tanto, sugieren que CcHAK1 está implicado en el transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad.

Todos los transformantes se inocularon también en medio que contenía 5 mM K<sup>+</sup> como control de la densidad de células inoculadas de cada uno de ellos. En esta condición se observó crecimiento por igual de los transformantes W<sub>Δ3</sub>-CcHAK1 y W<sub>Δ3</sub>-p.



**Figura 3.2** Ensayo de complementación de CcHAK1. Se muestra el crecimiento de las cepas transformadas con el plásmido vacío WΔ3-p y con CcHAK1 (a, b, c y d: transformantes) en medio sólido de FA-U con 5 mM K<sup>+</sup>, 300 y 100 μM de K<sup>+</sup> añadido y en ausencia del mismo.

to do prine la colidificación de los miemos. En nincuna de estas condicionem se observo

Para disminuir la concentración de K<sup>+</sup> en el agar, se realizó otro ensayo de complementación utilizando agar noble para la preparación del medio fosfato de arginina. La concentración de K<sup>+</sup> en este agar es de 15  $\mu$ M K<sup>+</sup>. Como resultado, al igual que en el primer ensayo de complementación, CcHAK1 permite recuperar la capacidad de crecimiento del mutante a una concentración de 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> (Figura 3.3). Lo que sugiere que CcHAK1 podría mediar el transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad.



**Figura 3.3** Ensayo de complementación de CcHAK1. Crecimiento de las cepas W $\Delta$ 3 transformadas con el plásmido vacío W $\Delta$ 3-p y con CcHAK1 (a y b) en medio sólido de fosfato de arginina (FA) con 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> añadido. Se utilizó agar noble (15  $\mu$ M K<sup>+</sup>).

# 3.4.1.2 CRECIMIENTO DE LOS TRANSFORMANTES DE LEVADURA EN CONCENTRACIONES MICROMOLARES DE POTASIO

Para evitar la contaminación por el K<sup>+</sup> inherente al agar de los medios sólidos, se realizó el estudio del crecimiento de los transformantes en cultivo líquido, en el que se puede controlar exactamente la concentración de cada uno de los componentes del medio y desde luego la concentración de K<sup>+</sup> (Figura 3.4).

Para este estudio se utilizó la levadura transformada con el plásmido vacío W∆3-p y la transformada con el ADNc total de CcHAK1-a. Debido a la homología de secuencia tan alta que existe entre el CcHAK1 de *C. chinense* y CaHAK1 de *C. annuum* descrita en el capitulo anterior, comparamos las curvas de crecimiento de los transformantes de levadura que expresan ambos ADNc. Para ello se transformó la cepa W∆3 con el plásmido pYPGE15 que contenía el ADNc total de *C. annuum* (CaHAK1) proporcionado por el Dr. Francisco Rubio (Departamento de Nutrición Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del, Segura-CSIC).

Como se muestra en la Figura 3.2, con 5 mM de K<sup>+</sup>, las tres cepas transformadas presentan un crecimiento similar. Sin embargo, a concentraciones micromolares de K<sup>+</sup> la cepa W $\Delta$ 3-p deja de crecer, debido su incapacidad de transportar K<sup>+</sup> a bajas concentraciones, mientras que los transformantes que expresan al transportador HAK crecen, incluso en presencia de 50  $\mu$ M K<sup>+</sup>. Curiosamente, el crecimiento de las levaduras que expresan CcHAK1 a concentraciones micromolares alcanza valores de densidad óptica más altos que las que expresan CaHAK1.

Estos resultados indican que la expresión de CcHAK1 al igual que la de CaHAK1 permite el crecimiento del mutante  $W\Delta 3$  a concentraciones micromolares de K<sup>+</sup> lo que sugiere un transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad.

TALIGNES IN CROMOLARES OF POTALIO

A second second second to the second seco

An and a set of the second completeness can all controls with a set of the second state and an California. Dibids a bit remainput the second state of the second second set of the control of California Control of the second second second second of the second second set of the control of the second second second second second of the second set of the California set of the second second second second second second second set of the California set of the second second second second second second set of the second set of the second second second second second second second set of the california set of the second second second second second second second set of the second set of the second second second second second second second set of the second set of the second second second second second second second second second set of the second function of the second second second second second second second second second function of the second function of the second se



**Figura 3.4** Curvas de crecimiento de cultivos de la cepa W $\Delta$ 3 transformada con el plásmido pYPGE15 vacio (círculos), con CcHAK1 (cuadrados) y con CaHAK1 (triángulos) en presencia de 5 mM (A), 500 (B), 300 (C), 100 (D) y 50  $\mu$ M (E) de K<sup>+</sup>.

103

### 3.4.1.3 ENSAYOS DE FLUJO Y ACUMULACIÓN DE CATIONES

Para confirmar que CcHAK1 es un transportador de K<sup>+</sup>, se realizó el estudio cinético de W $\Delta$ 3-CcHAK1 de entrada de K<sup>+</sup> y de Rb<sup>+</sup> a diferentes concentraciones. El Rb<sup>+</sup> es un análogo del K<sup>+</sup> que se suele utilizar en su lugar en este tipo de análisis ya que, al no existir en el interior celular permite la determinación de flujos netos de entrada.

En la Figura 3.5 la cepa transformada W $\Delta$ 3-CcHAK1 muestra una disminución en la concentración del K<sup>+</sup> del medio externo, lo que demuestra un transporte para este catión. Las levaduras transformadas agotan el K<sup>+</sup> del medio en un periodo de 120 min a partir de una concentración de 40  $\mu$ M K<sup>+</sup> y en 60 min a partir de 25  $\mu$ M K<sup>+</sup> aproximadamente, y conforme disminuye la concentración de K<sup>+</sup> (20  $\mu$ M) se produce una entrada más rápida. En cuanto a la cepa transformada con el plásmido vacío no se observa depleción alguna de K<sup>+</sup>, esto corrobora que la toma de K<sup>+</sup> es debida a la presencia de CcHAK1.

Al utilizar un análogo del K<sup>+</sup>, el Rb<sup>+</sup>; éste presenta una cinética de entrada muy similar aunque un poco más lenta, por lo que, CcHAK1 no discrimina entre el K<sup>+</sup> y el Rb<sup>+</sup> (Figura 3.6).

Without an end of the first sector of the se



**Figura 3.5** Entrada de K<sup>+</sup> en levaduras transformadas con el ADNc de CcHAK1 (W $\Delta$ 3-CcHAK1) (círculo abierto y cerrado y triángulo cerrado) y con el plásmido vacío (W $\Delta$ 3-p) (triángulo abierto). Previo ayuno de K<sup>+</sup> durante cuatro horas.



**Figura 3.6** Entrada de K<sup>\*</sup> (círculos cerrados) y Rb<sup>\*</sup> (círculos abiertos) en levaduras transformadas con el ADNc de CcHAK1 (W $\Delta$ 3-CcHAK1). Previo ayuno de K<sup>\*</sup> durante cuatro horas.

Para caracterizar mejor la función de CcHAK1, se realizó una cinética de entrada de Rb<sup>+</sup>, se añadieron al medio de ensayo distintas concentraciones externas de Rb<sup>+</sup>: 1, 0.5, 0.25, 0.10 y 0.05 mM. En la Figura 3.7 se muestra la acumulación gradual de Rb<sup>+</sup> dentro de la levadura transformada. Llegando a incorporar a partir de una concentración externa de 1 mM Rb<sup>+</sup> hasta 32 nmoles Rb<sup>+</sup> mg PS<sup>-1</sup> en un periodo de 35 min. Esta entrada de Rb<sup>+</sup> es menor a medida que la concentración externa de Rb<sup>+</sup> disminuye. A manera de control se utilizó W $\Delta$ 3-p, en donde no se observó una acumulación interna de Rb<sup>+</sup>. Con los datos de tres experimentos se calcularon los valores de K<sub>m</sub> y V<sub>max</sub> utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, siendo una K<sub>m</sub> aparente de 50  $\mu$ M Rb<sup>+</sup> y una V<sub>max</sub> 0.52 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> bajo estas condiciones.



**Figura 3.7** Concentración de Rb<sup>+</sup> interno en levaduras transformadas con el ADNc de CcHAK1 (W $\Delta$ 3-CcHAK1), suplementadas con 0.05, 0.1, 0.25, 0.50 y 1 mM Rb<sup>+</sup>. Las células fueron previamente ayunadas de K<sup>+</sup> durante cuatro horas.

Según los valores de V<sub>max</sub> obtenidos para CcHAK1, se puede decir que este transportador presenta una velocidad de entrada menor con respecto a otros ya reportados, como el de NcHAK1 con una V<sub>max</sub> 10 nmol Rb<sup>+</sup> mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (Haro *et al.*, 1999). En la Figura 3.8, se aprecia la diferencia en la velocidad de entrada por ambos transportadores. Por otro lado, la V<sub>max</sub> de CcHAK1 es mayor comparada con la reportada para CaHAK1 con V<sub>max</sub> 0.25 nmol Rb<sup>+</sup> mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (Martínez-Cordero *et al.*, 2004).





# 3.4.1.4 ESTUDIO DE INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE POTASIO MEDIADO POR CcHAK1

Se ha descrito previamente, que los transportadores de K<sup>+</sup> tipo HAK se inhiben en presencia de concentraciones milimolares de NH4<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> (Martínez-Cordero *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2007). Para determinar el efecto de estos cationes en W $\Delta$ 3-CcHAK1, se realizó un ensayos de complementación en gotas en medio FA-U que contenía 100 mM

K<sup>+</sup> suplementado con 20 Mm NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM CsCl o 50 mM NaCl. En la Figura 3.9, se puede observar que hay una disminución del crecimiento de W $\Delta$ 3-CcHAK1 en presencia de NH<sub>4</sub>Cl o CsCl como consecuencia de una inhibición del transporte de K<sup>+</sup>. Por otro lado, en presencia de NaCl se observa un crecimiento de los mutantes transformados con CcHAK1 (W $\Delta$ 3-CcHAK1), la mutante transformada con el plásmido, vacío, W $\Delta$ 3-p no mostro crecimiento.



Figura 3.9 Crecimiento de las levaduras transformadas con el ADNc de CcHAK1 (W∆3-CcHAK1) en presencia de NH₄Cl, CsCl y NaCl. W∆3-p: plásmido vacío.

Martínez-Cordero *et al* (2004), reportó que el CaHAK1 de *C. annuum* es sensible a concentraciones milimolares de Na<sup>+</sup>, por lo que la cepa transformada con CaHAK1, no es capaz de crecer en presencia de 50 mM de NaCl. Para corroborar el resultado obtenido en el ensayo anterior, se realizó otro ensayo de complementación en gotas utilizando el transformante CaHAK1 sensible a Na<sup>+</sup> (Martínez-Cordero *et al.*, 2004) y nuestro transformante, CcHAK1. Utilizamos medio FA-U que contenía 50 µM de KCI

suplementado con 50, 70 o 100 mM de NaCl. Al igual que en los otros ensayos, todos los transformantes se inocularon en medio que contenía 5 mM K<sup>+</sup> como control de la densidad de células inoculadas. En esta condición pudo observarse un crecimiento por igual de los transformantes W $\Delta$ 3-CcHAK1 y W $\Delta$ 3-p. En la figura 3.10, se puede observar que los dos transformantes que contienen a HAK1, crecen en presencia de 50  $\mu$ M de KCl. Este crecimiento se inhibe en las cepas transformadas con el plásmido vacío y con CaHAK1 en presencia de las diferentes concentraciones de NaCl. Por lo contrario, CcHAK1 es capaz de crecer hasta en concentraciones de 100 mM de NaCl, no inhibiéndose así el transporte de alta afinidad de K<sup>+</sup>.



50 µM KCl



**Figura 3.10** Crecimiento de las levaduras transformadas con el ADNc de CaHAK1 (WΔ3-CaHAK1) (Martínez-Cordero *et al.*, 2004) y CcHAK1 (WΔ3-CcHAK1) en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. WΔ3-p: plásmido vacío.

Para determinar el efecto de que podrían tener estos cationes sobre el transporte de K<sup>+</sup> en el rango micromolar, se realizaron estudios de depleción de K<sup>+</sup>. En la figura 3.11, se muestra el efecto del NH<sub>4</sub>Cl y CsCl sobre el transporte de K<sup>+</sup> de CcHAK1. En ausencia de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, los transformantes que expresan el ADNc de CcHAK1 presentan una transporte de K<sup>+</sup>, que se observa con la depleción del K<sup>+</sup> externo, llegándolo a agotar en aproximadamente 90 min. Sin embargo en presencia de 1 mM de NH<sub>4</sub>Cl, el transporte de K<sup>+</sup> se ve completamente inhibido (Figura 3.11A). Éste mismo resultado se observa al utilizar 1mM CsCl (Figura 3.11B).



**Figura 3.11** Efecto del NH<sub>4</sub>CI y CsCI en la toma de K<sup>+</sup> de alta afinidad de mediado por CcHAK1. En presencia de 1 mM de NH<sub>4</sub>CI (A) y CsCI (B), sin NH<sub>4</sub>CI y CsCI (círculos cerrados). Previo ayuno de K<sup>+</sup> durante cuatro horas.

Al estudiar la entrada de K<sup>+</sup> en presencia de 1mM NaCl, se observó que ésta no resulta inhibida, agotándose el K<sup>+</sup> primero en el medio en ausencia de NaCl (Figura 3.12A). A pesar que el transporte de K<sup>+</sup> se mantiene se puede apreciar un retraso en la disminución del K<sup>+</sup> en el medio externo, esto se hace más marcado al repetir este mismo ensayo en presencia de 5 mM de NaCl (Figura 3.12B).



**Figura 3.12** Efecto del NaCl en la toma de K<sup>+</sup> de alta afinidad mediado por CcHAK1. En ausencia de NaCl (círculos cerrados) y en presencia de 1mM de NaCl (círculos abiertos. A) 1 mM NaCl y B) 5 mM NaCl. Previo ayuno de K<sup>+</sup> durante cuatro horas.

# 3.4.1.5 CRECIMIENTO DE LOS TRANSFORMANTES DE LEVADURA EN PRESENCIA DE CLORURO DE SODIO

Hasta ahora se ha demostrado que W $\Delta$ 3-CcHAK1 puede crecer en medio FA suplementado con 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> y 50 mM NaCl y que el transporte de alta afinidad de K<sup>+</sup> no se inhibe en presencia de 1 mM de NaCl. Para determinar si el NaCl no afecta el crecimiento del transformante, se utilizó medio FA menos uracilo suplementado con 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> y en ausencia o presencia de 10 mM NaCl. La densidad óptica se midió durante 4 días consecutivos para determinar el crecimiento (Figura 3.13).

En este ensayo se utilizó la cepa  $W\Delta 3$  transformada con el transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad de *C. annuum* (CaHAK1) ya que se ha reportado que este transportado en sensible a concentraciones milimolares de sodio (Martínez-Cordero *et al.*, 2004).

En la Figura 3.12A se observa un crecimiento normal de los tres transformantes en presencia de 5 mM K<sup>+</sup>. A concentraciones de 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> este crecimiento se detiene en W $\Delta$ 3-p que posee el plásmido vacío, por el contrario W $\Delta$ 3-CaHAK1 y W $\Delta$ 3-CcHAK1 crece (Figura 3.13B). Este crecimiento se mantiene aún en presencia de 10 mM NaCl, no afectando la presencia de éste en concentraciones milimolares al crecimiento de W $\Delta$ 3-CcHAK1 pero si al crecimiento de W $\Delta$ 3-CaHAK1, el cual se ve disminuido (Figura 3.13C).



**Figura 3.13** Crecimiento de la cepa W $\Delta$ 3 transformada con el plásmido pYPGE15 vacio (rombos), con CcHAK1 (triángulos) y con CaHAK1 (cuadrados), en presencia de 5 mM K<sup>+</sup> (A), 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> (B), 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> más 10 mM NaCl (C).

# 3.5 DISCUSIÓN

Los transportadores tipo HAK exhiben una alta afinidad por el K<sup>+</sup>, pero también una baja capacidad de discriminación entre éste, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>, no así en el caso de Na<sup>+</sup> o de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. (Rubio *et al.*, 2000; Santa-María *et al.*, 1997). En lo que al funcionamiento de estos transportadores se refiere, existen evidencias que sugieren que la incorporación de K<sup>+</sup> se produce en simporte con H<sup>+</sup>.

En este trabajo se aisló el ADNc total de *Capsicum chinense* Jacq. (CcHAK1), que codifica para un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad. Mediante estudios de complementación funcional (Figura 3.2 y 3.3) y curvas de crecimiento (Figura 3.4), se demostró que CcHAK1 es capaz de restaurar la toma de K<sup>+</sup> en concentraciones del orden micromolar en las mutantes de levadura. Concretamente se utilizó la cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* W $\Delta$ 3 defectiva en los sistemas de transporte de K<sup>+</sup> TRK1 y TRK2 (Haro y Rodríguez-Navarro, 2003). Mediante la expresión de CcHAK1 en la mutante de levadura se determinó un valor de K<sub>m</sub> de 50 µM Rb<sup>+</sup> y una V<sub>max</sub> 0.52 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> y con los ensayos de acumulación de cationes se demostró que CcHAK1 no discrimina entre K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup> (Figura 3.7).

Entre los transportadores que se han clonado se encuentra el de cebada (*Hordeum vulgare*) HvHAK1 (Santa-María *et al.*, 1997). La expresión en levadura de HvHAK1 demostró que es un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad, que no discrimina entre K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup> y que es inhibido por Na<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. También se aisló el ADNc de *A. thaliana* AtHAK5, y al ser expresado en levadura presentaba un transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad que no es capaz de discriminar entre el K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> (Rubio *et al.*, 2000).

En el año 2004, se aisló el ADNc de *Capsicum annuum*, CaHAK1 (Martínez-Cordero *et al.*, 2004) el cual caracterizan funcionalmente. La cepa de levadura W $\Delta$ 3 transformada con el plásmido de expresión pYPGE15 que contiene al ADNc de CaHAK1, es capaz de crecer en medio FA suplementado con 100  $\mu$ M de K<sup>+</sup>, restaurando así la toma de baja afinidad de K<sup>+</sup>. Mientras que la cepa transformada con el plásmido vacío no crece bajo estas condiciones. En otro estudio más reciente, Su *et al.* (2007) caracteriza un transportador de K<sup>+</sup> tipo HAK en raíces de *Aeluropus littoralis.* En sus resultados, demuestra mediante una prueba de crecimiento en medio SD, que la cepa de levadura

W $\Delta$ 3 al ser transformada con el plásmido de expresión pYES2.0 que contiene el ADNc AlHAK, crecer en presencia de 100  $\mu$ M de K<sup>+</sup>, restaurándose así el crecimiento a baja afinidad. Por otro lado, Alemán *et al* (2009) clono el ADNc de *Thellungiela halophila*, ThHAK5 que codifica para un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad. En cuanto al transporte de K<sup>+</sup>, este de ve disminuido en presencia de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>.

Se ha demostrado en algunos miembros de la familia HAK, que la entrada de K<sup>+</sup> a través de estos transportadores se ve afecta negativamente en presencia de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> (Su *et al.*, 2007; Martínez-Cordero *et al.*, 2004; Santa-María *et al.*, 1997), En cuanto al NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, se sabe que cuando éste se encuentra a concentraciones elevadas se produce una inhibición del transporte, por el contrario, si se aumenta la concentración externa de K<sup>+</sup> los efectos tóxicos del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pueden verse disminuidos (Szczerba *et al.*, 2009). La disminución del crecimiento y la marcada inhibición del transporte mostrada por CcHAK1 al ser expresado en levadura, en presencia de 20 mM NH<sub>4</sub>Cl y 5 mM CsCl en los ensayos de complementación funcional (Figura 3.9) y de 1 mM NH<sub>4</sub>Cl y CsCl en los ensayos cinéticos (Figura 3.11), constituyen una evidencia del papel que desempeña en la sensibilidad a estos compuestos.

Los estudios en electrofisiología y genética molecular en plantas sugieren que la homeostasis del Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> es un mecanismo clave en la tolerancia a estrés salino. Debido a que el estrés salino impacta en la homeostasis del K<sup>+</sup> en todos los órganos de la planta (Shabala y Cuin, 2008). Se ha demostrado que los niveles de transcripción y la actividad de varios de los transportadores de la familia KT/HAK/KUP se modifican en condiciones salinas. HAK1 de cebada, HvHAK1 al ser expresado en levadura interviene en el transporte de Na<sup>+</sup> de baja afinidad y en la toma de K<sup>+</sup> de alta afinidad (Santa-María *et al.*, 1997). También se ha demostrado que concentraciones elevadas de Na<sup>+</sup> inhiben el transporte de K<sup>+</sup> por AtKUP1 (Fu y Luan, 1998) y AtHAK5 (Rubio *et al* 2000). Por otra parte, tanto la carencia de K<sup>+</sup> como el estrés por NaCl aumentan los niveles de expresión de las proteínas McHAK1 y McHAK2 de *Mesembryanthemum crystallinum* (Su *et al.*, 2002). Parecen estar implicadas el mantenimiento de los niveles de K<sup>+</sup> citoplasmático y/o en la regulación de la turgencia bajo condiciones en las que el Na<sup>+</sup> externo inhibe la toma de K<sup>+</sup> y el Na<sup>+</sup> celular lo reemplaza. En lo que respecta a al transportador CcHAK, tanto el crecimiento como el transporte de K<sup>+</sup> no se inhibe en presencia de concentraciones

milimolares de NaCl (Figuras 3.9, 3.12 y 3.13).

Los análisis filogenéticos de los transportadores de la familia KT/HAK/KUP, permite la distinción de cuatro grupos (Rubio *et al.*, 2000), caracterizándose el grupo I por incluir, aparentemente, sólo transportadores de alta afinidad a K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup>, en contraposición al grupo II, que mayoritariamente engloba transportadores de moderada o baja afinidad. Estos últimos, parecen ser que, aunque no discriminan entre K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup>, si son menos permeables a Cs<sup>+</sup> (Rubio *et al.*, 2000; Bañuelos *et al.*, 2002). En cuanto al grupo III y IV, agrupa transportadores que son permeables a bajas y altas concentraciones de Na<sup>+</sup> respectivamente (Takahashi *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2000). En base a estos reportes y tras la caracterización bioquímica y molecular del transportador CcHAK1 se sugiere que éste sea ubicado dentro del grupo I; ya que presenta un transporte de alta afinidad a K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup> y no discrimina entre éstos, es sensible a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>. Por otra parte, CcHAK1 presenta una característica que no comparte con los transportadores de este grupo, que es su mayor tolerancia a concentraciones milimolares de Na<sup>+</sup>.

Mediante un alineamiento de secuencias de aminoácidos de CcHAK1 con los transportadores ubicados dentro del grupo I (Alemán et al., 2009) se encontró que todos ellos comparten el mismo aminoácido, aspargina (N) en la posición 356. En el caso de CcHAK1 no comparte esta característica, éste en su lugar presenta una treonina en la misma posición (Cuadro 3.3). Esta diferencia en la secuencia podría ser la responsable de proporcionar a CcAHK1 cierto grado de tolerancia a concentraciones milimolares de Na<sup>+</sup>; ya que en un estudio realizado por Mangano et al (2008) en donde reportan la identificación y caracterización funcional de dos versiones de mutaciones puntuales en HvHAK1, demuestran que éstas mutaciones confieren a la levadura S. cerevisiae WA3 trk1/2trk2, un crecimiento en un ambiente salino. Las mutaciones corresponden a la substitución de una valina por la isoleucina ubicada en la posición 366 del octavo segmento transmembranal y la substitución de una arginina por una cisteina en la posición 591 del extremo C-Terminal de la proteína, también caracterizaron una quimera que presenta ambas mutaciones. El estudio cinético mediante la ecuación de Michaelis-Menten demostró que la V<sub>max</sub> para Rb<sup>+</sup> es mayor en las mutantes comparadas con la no mutante; y estas V<sub>max</sub> no cambian en presencia de 75 mM de NaCl. Las mutaciones confieren a W $\Delta$ 3 trk1 $\Delta$ trk2 un mayor crecimiento en presencia de 50 y 100 mM de NaCl; así como también una mayor resistencia a LiCl (25 y 100 mM) y NH<sub>4</sub>Cl (75 y 100 mM) en comparación con la no mutante y siento el crecimiento y la resistencia mayor en la quimera que presenta las dos mutaciones. La mutación puntual podría ser una estrategia para poder determinar si el cambio de aminoácido que se presenta en CcHAK1 esta relacionado con la tolerancia a la salinidad, esta es una pregunta que aún faltan por responder.

Transportador	No. de aminoácidos	% de identidad con CaHAK1	Aminoácido posición 356
CcHAK1	804		Treonina (T)
CaHAK1	804	99	Aspargina (N)
SIHAK5	786	85	Aspargina (N)
OsHAK1	801	52	Aspargina (N)
HvHAK1	775	51	Aspargina (N)
AtHAK5	785	57	Aspargina (N)
ThHAK5	790	57	Aspargina (N)

Cuadro 3.3 Comparación de identidad entre CcHAK1 y CaHAK1 (AY560009), SIHAK5 (DQ489721), OsHAK1 (AJ427970), HvHAK1 (AF025292), AtHAK5 (AF129478.1 y ThHAK (EF177193). Clustal W2 (http://www.ebi.ac.uk/Tool/ clustalw2/index.html).

Con este estudio se proporcionan nuevos conocimientos sobre el mecanismo de transporte de K<sup>+</sup> en el género *Capsicum*, ya que la caracterización de CcHAK1 de *C. chinense*, sugiere que es un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad y que presenta características que ya han sido estudiadas en otros géneros y que se comparten por pertenecer a la familia de transportadores KT/HAK/KUP. Por otro lado, CcHAK1 posee una característica más marcada que el CaHAK1 de *C. annuum*, que es su mayor tolerancia a concentraciones milimolares de Na<sup>+</sup>, esta característica podría brindarle beneficios a éste cultivo; ya que hoy en día el problema de salinidad en las tierras cultivables va en aumento y es necesario contar con cultivos que toleren y se desarrollen bajo estas condiciones de estrés.

## **3.6 CONCLUSIONES**

- CcHAK1 complementa el transporte de K<sup>+</sup> en rango micromolar restaurando el crecimiento de la mutante de levadura W∆3 en concentración de 50 y 100 µM de K<sup>+</sup>, lo que sugiere que CcHAK1 codifica para un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad.
- 2. El transporte de K<sup>\*</sup> mediado por CcHAK1 es inhibido por NH₄Cl y CsCl y que en presencia de concentraciones milimolares de NaCl no se inhibe pero hay una ligera disminución en la velocidad. Esto sugiere que el transporte de K<sup>\*</sup> mediado por CcHAK1 es inhibido competitivamente en presencia de NH₄ y Cs<sup>\*</sup> y que puede tolerar la presencia de Na<sup>\*</sup> en el rango milimolar.
- CcHAK1 presenta una K<sub>m</sub> alrededor de 50 μM para Rb<sup>+</sup> y una V<sub>max</sub> de 0.52 nmol mg min<sup>-1</sup>. CcHAK1 presenta un valor de Km mayor comparada con la de otros transportadores, pero siempre dentro del rango de alta afinidad.

A contraction of a single provide a new providence of the single pro
# BIBLIOGRAFÍA

- Alemán F.; M. Nieves-Cordones; V. Mártinez; F. Rubio. (2009). Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K<sup>+</sup> transporters of *Theollungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. Environmental and Experimental Botany 65:263-269.
- Bañuelos M. A.; B. Garciadeblas; B. Cubero; A. Rodriguez-Navarro. 2002. Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. Plant Physiology 130:784-795.
- Brunelli J. P.; M. L. Pall. (1993). A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DNA sequences. Yeast 9:1299-1308.
- Dreyer I.; C. Horeau; G. Lemaillet; S. Zimmermann; D. R. Bush; A. Rodríguez-Navarro; D. P. Schachtman; E. P. Spalding; H. Sentenac; R. F. Gaber. (1999). Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. Journal Experimental Botany 50:1073-1087.
- Elble R. (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. Biotechniques 13:18–20.
- Fu H. H.; S. Luan. (1998). AtKUP1: A dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from Arabidopsis. Plant cell 10:63-73.
- Haro R.; A. Rodriguez -Navarro. (2003). Functional analysis of the M2D helix of the TRK1 potassium transporter of Saccharomyces cervisiae. Biochimica Biophysica Acta 1613:1-6.
- Mangano S.; S. Silberstein; G. E. Santa-María. (2008). Point mutations in the barley HvHAK1 potassium transporter lead to improved K<sup>+</sup>-nutrition and enhanced resistance to salt stress. Federation of European Biochemical Societies, Letters 582:3922-3928.
- Martinez-Cordero M.; V. Martínez; F. Rubio. (2004). Cloning and fuctional characterization of the high-affinity K<sup>+</sup> transporter HAK1 of pepper. Plant Molecular Biology

56:413-421.

- Rodriguez-Navarro A.; J. Ramos. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal Bacteriology 159:940-945.
- Rodriguez-Navarro, A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. Biochim. Biophys. Acta 1469: 1-30
- Rubio F.; G. E. Santa-Maria; A. Rodríguez-Navarro. (2000). Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. Physiologia Plantarum 109:34-43.
- Shabala S.; T. A. Cuin. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. Physiologia Plantarum 133:651-669.
- Santa-María G. E.; F. Rubio; J. Dubcovsky; A. Rodriguez-Navarro. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. Plant Cell 9: 2281-2289.
- Sherman F. (1991). Getting started with yeast. Methods Enzymology, 194:3-21.
- Su Q.; S. Feng; L. An; G. Zhang. (2007). Cloning and functional expression in Saccharomyces cereviae of a K<sup>+</sup> transporter, AIHAK, from the graminaceous halophyte, *Aeluropus littoralis*. Biotechnology Lett 29:1959-1963.
- Su H.; D. Golldack; C. Zhao; H. J. Bohnert. (2002). The expression of HAK-type K<sup>+</sup> transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. Plant Physiology 129:1482-1493.
- Szczerba M. W.; D. T. Britto y H. J. Kronzucker. (2009). K<sup>+</sup> transport in plants: Physiology and molecular biology. Jourinal of Plant Physiology166:447-446.
- Takahashi R.; N. Takayoshi; N. Ichizen; T. Takano. (2007). Cloning and functional analysis of the K<sup>+</sup> transporter, PhaHAK2, from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants. Biotechnology Lett 29:501-506.

# CAPÍTULO IV

# CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

El chile habanero es un cultivo de gran importancia económica y que es cultivado ampliamente en la Península de Yucatán. Los suelos del Estado son considerados poco productivos para el uso agrícola por sus terrenos carbonatados y la presencia de afloramientos rocosos, por lo que resulta necesario el empleo de fertilizantes para aumentar la producción de los cultivos. Se sabe que las concentraciones de K<sup>+</sup> se presentan en un rango de 0.1 a 6 mM K<sup>+</sup>, estas concentraciones son altas; sin embargo, no todo el K<sup>+</sup> está disponible para ser absorbido por la planta. De ahí la importancia de demostrar y estudiar un mecanismo de toma de K<sup>+</sup> que le permita absorberlo en concentraciones micromolares a partir de la solución del suelo.

El K<sup>+</sup> es un macronutriente esencial para el desarrollo de las plantas, y está relacionado en muchos procesos fisiológicos (Wakeel, 2011). La concentración de K<sup>+</sup> en la interface entre la raíz y el suelo está dentro del rango micromolar de 0.1 a 1 mM (Wang y Wu, 2010; Maathius, 2009); por lo que el K<sup>+</sup> es absorbido por la planta en contra de su gradiente de concentración. Se sabe que el transporte de K<sup>+</sup> a partir del ambiente externo hacia la célula se logra a través de canales y transportadores localizados en la membrana plasmática de las células de la raíz (Ward *et al.*, 2009; Véry y Sentenac, 2006). Un número de genes que codifican para canales y transportadores de K<sup>+</sup> han sido identificados en muchas especies de plantas (Alemán *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2007; Martínez-Cordero *et al.*, 2004; Bañuelos *et al.*, 2002; Haro *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 1992). En *Arabidopsis* por ejemplo, se han identificado un total de 71 canales y transportadores principalmente dividido en seis familias de genes, incluyendo tres familias de canales (Shaker, TPK y Kir-like) y tres familias de transportadores (KUP/HAK/KT, HKT, CPA) (Wang y Wu, 2010).

En este trabajo nos enfocamos a la clonación y caracterización de un transportador de la familia KUP/HAK/KT en raíces de *C. chínense* Jacq, al cual denominamos CcHAK1 (Figura 2.5). Mediante el estudio *in silico* de CcHAK1 se determinó que posee 2416 pb,

codifica a una proteína de 804 aminoácidos con un peso molecular de 89.86 KDa y presenta una identidad del 99% con CaHAK1 y 85% con SIHAK5.

La caracterización funcionalmente mediante un sistema heterólogo (cepa mutante de *S. cereviseae;* W $\Delta$ 3) sugiere que CcHAK1 codifica para un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad, siendo capaz de restaurar el crecimiento y transportar K<sup>+</sup> en un rango micromolar en la mutante de levadura W $\Delta$ 3 (Figura 3.4 y 3.5). Una característica sobresaliente que presentó CcHAK1 fue su tolerancia a concentraciones milimolares de NaCl (Figura 3.9, 3.10, 3.12 y 3.13); característica que no comparte con el CaHAK1 de *C. annuum* (Martínez-Cordero *et al.*, 2004) a pesar de que los dos pertenece al mismo Género.

En condiciones naturales, las plantas se encuentran continuamente sometidas a situaciones ambientales cambiantes, lo que trae como consecuencia una serie de estímulos que influyen en el desarrollo y productividad de los cultivos. Entre los factores que generan estrés se incluye a la salinidad (Rodríguez-Pérez., 2006). La irrigación de cultivos con aguas de alto contenido salino y el uso excesivo de fertilizantes provoca, tras la evapotranspiración, la acumulación de sales en el suelo. Así, este fenómeno convierte en improductivos a los suelos agrícolas (Zhu, 2001).

Debido a que la salinidad inhibe el crecimiento de las plantas, y este problema crece al paso del tiempo, es importante contar con cultivos que toleren o resistan cierto grado de salinidad (Villa-Castorena *et al.*, 2006). La tolerancia a la salinidad depende de la habilidad de una especie o cultivar para controlar la absorción y el transporte de Na y Cl al tejido fotosintético (Tester y Davenport, 2003; White y Broadley, 2001). En mucho de los cultivos la salinidad disminuye la absorción de nutrimentos tales como K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Villa- Castorena *et al.*, 2010; Al-Karaki, 2000; Yahya, 1998). El efecto del Na<sup>+</sup> sobre la absorción de nutrientes se debe a que éste catión interfiere con la actividad de transporte iónico a nivel de la membrana celular de la raíz, afectando a transportadores y canales de K<sup>+</sup>, lo que impide su toma (Epstein, 1961; Pardo y Quintero, 2002). De igual manera, se ha demostrado que el Na<sup>+</sup> inhibe competitivamente la toma de K<sup>+</sup>; de ahí la importancia de que la toma de alta afinidad de K<sup>+</sup> de CcHAK1 no se inhiba en presencia de concentraciones milimolares de NaCl.

Hemos demostrado, que el crecimiento en los transformantes de levadura se mantiene en

50  $\mu$ M de KCI suplementado hasta con 100 mM de NaCI (Figura 3.10) y que el transporte de K<sup>+</sup> a cargo de CcHAK1 no se inhibe hasta una concentración de 5 mM de NaCI (Figura 3.12). Sin embargo, aún es necesario determinar la concentración de NaCI a la cual el transporte se inhibe, así como la caracterización de CcHAK1 en raíces de plántulas de *C. chínense* Jacq., para corroborar su comportamiento. Sobre este aspecto, en el laboratorio se han realizado cinéticas de entrada de K<sup>+</sup> en raíces de plántulas previamente ayunadas de K<sup>+</sup>, y se demostró un transporte de alta afinidad y que éste es inhibido en presencia de NH4<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> (Ramón *et al.*, 2011).

El cultivo de chiles es una de las especies vegetales más importantes del mundo y se clasifica como una especie moderadamente tolerante a la salinidad (Maas y Hoffman, 1997 citado por Villa *et al.*, 2006). Villa *et al* (2006) reporta, que la salinidad afecta diferencialmente a la transpiración y a la absorción de nutrimentos (N<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup> y Mg<sup>+</sup>) durante el ciclo de crecimiento del chile (*C. annuum* L.). En estudios más resientes, Niu *et al* (2010) al comparar cinco cultivares de *C. annuum* L. (Early Jalapeño, Golden Treasure, NuMex Sweet, NuMex Joe E. Parker, and Santa Fe Grande) y dos cultivares de *C. chinense* Jacq. (Habanero y Pimienta De Chiera) estos últimos fueron menos tolerantes a la salinidad. Los estudios de salinidad en *C. chinense* son muy escasos sin embargo, en el laboratorio se ha demostrado que a concentraciones milimolares de KCl se aminoran los daños causados en las plántulas hasta por 75 mM de NaCl. Indirectamente, en este trabajo al evaluar el nivele de expresión de CcHAK1 en la raíz, se observó que las plántulas son capaces de sobrevivir en solución Hoagland con 50  $\mu$ M de KCl y 50 mM de NaCl durante 10 días, asimismo, los niveles de transcritos en estas raíces no disminuyen hasta una concentración de 10 mM de NaCl (Figura 2.10).

Con base en lo anterior, un aumento en la selectividad a favor del K<sup>+</sup> y en contra del Na<sup>+</sup>, podría conducir a la obtención de plantas más tolerantes a la salinidad. Por lo que este trabajo proporcionará las bases para la realización de otros estudios más específicos y enfocados a la salinidad como por ejemplo: la obtención raíces de plántulas de *C. chinense* transformadas con el ADNc de CcHAK1 mediante *Agrobacterium rhizogenes* con el objetivo de sobreexpresar a CcHAK1 y determinar si esto aumenta la eficiencia del transporte de alta afinidad de K<sup>+</sup>, y como consecuencia el nivel de tolerancia a la salinidad que se ha demostrado en este trabajo, así como también, desarrollar prácticas de manejo

para minimizar los efectos adversos de la salinidad, como un buen manejo adecuado de la fertilización potásica, esto requiere entender los mecanismos que determinan la respuesta de la planta a la salinidad, a la nutrición del K<sup>+</sup> y a la interacción entre ambos.

# BIBLIOGRAFÍA

- Alemán F.; M. Nieves-Cordones; V. Martínez; F. Rubio. (2009). Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K<sup>+</sup> transporters of *Theollungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. Environmental and Experimental Botany 65:263-269.
- Al-Karaki, G. N. 2000. Growth, sodium, and potassium uptake and translocation in salt stressed tomato. Journal of Plant Nutrition 23: 369-379.
- Anderson J. A; S. S. Huprikar; L. V. Kochian; W. J. Lucas; R. F. Gaber. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89:3736-3740.
- Bañuelos M.A., B. Garciadeblas; B. Cubero; A. Rodríguez-Navarro. (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. Plant Physiology 130:784-795.
- Haro R.; L. Sainz; F. Rubio; A. Rodríguez-Navarro. (1999). Cloning of two genes encoding potassium transporters in Neurospora crassa and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology 31(2):511-520.
- Maas, E. V. y G. J. Hoffman. (1977). Crop salt tolerance current assessment. J. Irrig. Drainage Div. Am. Soc. Civ. Eng. 103:115-134; citado por Villa-Castorena M.; E.
  A. Catalán-Valencia; M. A. Inzunza-Ibarra; I. Sánchez-Cohen. (2006). Transpiration and Nutrient Uptake by Pepper Plants as Affected by N Fertilization and Soil Salinity. TERRA Latinoamericana 24(3):391-399.
- Mangano S.; S. Silberstein; G. E. Santa-María. (2008). Point mutations in the barley HvHAK1 potassium transporter lead to improved K<sup>+</sup>-nutrition and enhanced resistance to salt stress. Federation of European Biochemical Societies Letters 582:3922-3928.

- Martínez-Cordero M.; V. Martínez; F. Rubio. (2004). Cloning and fuctional characterization of the high-affinity K<sup>+</sup> transporter HAK1 of pepper. Plant Molecular Biology 56:413-421.
- Niu G.; D. S. Rodriguez; E. Call; P. W. Bosland; A. Ulery; E. Acosta. (2010). Responses of eight chile peppers to saline water irrigation. Scientia Horticulturae 126:215-222.
- Rodríguez-Pérez L. (2006). Physiological implications of osmoregulation in plants. Agronomía Colombiana 24(1):28-37.
- Su Q.; S. Feng; L. An; G. Zhang. (2007). Cloning and functional expression in Saccharomyces cereviae of a K<sup>+</sup> transporter, AIHAK, from the graminaceous halophyte, *Aeluropus littoralis*. Biotechnology Letters 29:1959-1963.
- Tester M.; R. Davenport. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher pants. Annual Botany 91:503-527.
- Véry A. A.; H. Sentenac. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. Annual Review Plant Biology 54:575-603.
- Villa-Castorena. M.; E. A. Catalán-Valencia.; M. A. Inzunza-Ibarra.; A. L. Ulery. (2006). Sodium and chloride uptake and translocation in chile plants fertilized with nitrogen and grown under saline stress. Revista Fitotecnia Mexicana 29(1):79-88.
- Villa-Castorena M.; E. A. Catalán-Valencia; M. A. Inzunza-Ibarra; I. Sánchez-Cohen. (2006). Transpiration and Nutrient Uptake by Pepper Plants as Affected by N Fertilization and Soil Salinity. TERRA Latinoamericana 24(3):391-399.
- Wakeel A.; M. Farooq; M. Qadir; S. Schubert. (2011). Potassium substitution by sodium in plants. Plant Sciences 30:401-413.
- Wang Y.; W-H. Wu. (2010). Plant sensing and signaling in response to K<sup>+</sup> deficiency. Molecular Plant 3(2):280-287.
- Ward J.; P. Mäser; J. Schroeder. (2009). Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. Annual Review Physiology 71:59-82.

- White P. J.; M. R. Broadley. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. Annual Botany 88:967-988.
- Yahya A. (1998). Salinity effects on growth and on uptake and distribution of sodium and some essential mineral nutrients in sesame. Journal of Plant Nutrition 21:1439-1451.

# ANEXO 1

# PRIMERAS EVIDENCIAS DE UN TRANSPORTADOR DE K<sup>+</sup> DE ALTA AFINIDA DE RAÍCES DE CHILE HABANERO (*C. chinense* Jacq).

Parte de este trabajo formó parte de la publicación:

José Ramón Pacheco-Arjona, <u>Nancy Ruiz-Lau</u>, Fátima Medina-Lara, Yereni Minero-García, Ileana Echevarría-Machado, César De los Santos-Briones, Manuel Martínez-Estévez. Effects of ammonium nitrate, cesium chloride and tetraethylammonium on high-affinity potassium uptake in habanero pepper plantlets (*Capsicum chinense* Jacq.). African Journal of Biotechnology 10 (62): 13418-13429, 2011.

# 1.1 INTRODUCCIÓN

El chile habanero es un cultivo de gran demanda a nivel nacional e internacional; esto debido a las características que presentan su frutos como color, aroma y picor. Se ha comprobado que estas características dependen de tanto de factores bióticos y como abióticos. En el Estado de Yucatán el chile habanero es cultivado ampliamente es algunas zonas: esto a pesar de las características que presentan sus suelos, las cuales no son las más aptas para la agricultura debido a la presencia de terrenos carbonatados, la afloramientos rocosos y su poca profundidad (Borges-Gómez et al., 2005). En cuanto a la disponibilidad de nutrientes se sabe que la concentración de K<sup>+</sup> disponible para la planta en suelos con estas características representa tan solo del 1 al 2% del K<sup>+</sup> total, el cual está dado por la suma del Ki y el Ka (K\* intercambiable y K\* en la solución del suelo. respectivamente). Teniendo en cuenta que el K<sup>+</sup> es un macronutriente y como tal es absorbido en mayor cantidad por las plantas (Schulze et al., 2002) comprendiendo del 8 al 10% de su peso seco (Martínez-Cordero et al., 2005; Grabov, 2007; Gierth y Mäser, 2007); el chile habanero debe de poseer un sistema de transporte que le permita absorber el K\* en concentraciones micromolares, dándole la característica de crecer en ambientes pobre en éste ión.

Entre los transportadores de K<sup>+</sup> de alta afinidad se encuentran los de la familia KUP/HAK/KT, los cuales participan en la homeostasis de K<sup>+</sup> en las células vegetales. En lo que respecta al género Capsicum, solo se ha caracterizado un transportador perteneciente a esta familia, denominado CaHAK1 (Martínez-Cordero et al., 2004). Con su caracterización se demostró que se induce en ausencia de K<sup>+</sup> y que presenta un transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad al ser expresado en levaduras deficientes en este transporte. En base a esto, se planteó la posibilidad de que el chile habanero por pertenecer a éste género y por desarrollarse en suelos donde las concentraciones de K<sup>+</sup> disponible son bajas cuente con este tipo de mecanismo de toma de K<sup>+</sup>. Por lo que se evaluó la toma de K<sup>+</sup> en plántulas de chile habanero sometidas a déficit de K<sup>+</sup>, así como la inhibición de éste transporte en presencia de inhibidores como NH4<sup>+</sup>, CsCl<sup>+</sup> y bloqueadores de canales de K<sup>+</sup> (TEA). A nivel molecular se determinó la presencia de un fragmento que presentó una identidad del 98% con el transportador de C. annuum, CaHAK1. Los resultados obtenidos en este trabajo previo fueron la base para clonar y caracterizar funcionalmente a un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad en raíces de chile C. chinense Jacq., CcHAK1.

# 1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

## 1.2.1 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) las cuales fueron desinfectadas durante 5 min con alcohol al 80%, posteriormente lavadas con agua estéril por 4 min y se agitaron por 15 min en presencia de hipoclorito de sodio (cloralex) al 30%. Posteriormente se lavaron con agua estéril por 4 min y fueron almacenadas durante 72 h en dicha agua y posteriormente germinadas en agrolita a 28 °C. Después de siete días las plántulas se colocaron en contenedores de plástico de 600 ml cada uno, conteniendo la solución Hoagland modificada a un quinto de su fuerza iónica (H<sup>1</sup>/<sub>5</sub>): 1.2 mM KNO<sub>3</sub>, 0.8 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.2 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 0.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 µM CaCl<sub>2</sub>, 12.5 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 µM MnSO<sub>4</sub>, 1 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0.5 µM CuSO<sub>4</sub>, 0.1 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.1 µM NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 10 µM Fe-EDDHA. Las plántulas crecieron en condiciones de fotoperiodo: 16 h luz, 8 h oscuridad, a temperaturas de 25 y 20 °C, respectivamente. La humedad relativa fue de

65% (día) y 85% (noche). La solución nutritiva fue reemplazada cada semana con solución fresca sin  $K^*$ .

## **1.2.2 EXPERIMENTOS PARA EVALUAR LA ABSORCIÓN DE POTASIO**

Se utilizaron plántulas de 45 días de edad cultivadas como se describe en el apartado 1.2.1. Para los tratamientos de ausencia de K<sup>+</sup> estas se transfirieron en un medio nutritivo, eliminando el K<sup>+</sup> por 0, 72, 96 y 120 h respectivamente. El medio contenía 1.4 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.1 mM Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0.2 mM MgSO<sub>4</sub> y los micronutrientes descritos anteriormente. Después de estos periodos se seleccionaron plántulas que presentaban un tamaño homogéneo y fueron pesadas en grupos de 15 plántulas manteniendo el peso de los grupos lo más homogéneo posible. Después se enjuagaron con solución H<sup>1</sup>/<sub>5</sub> fría, libre de K<sup>+</sup> y en el momento cero se transfirió a contenedores con 250 ml de una solución H<sup>1</sup>/<sub>5</sub> libre de K<sup>+</sup> suplementada con 50, 100 y 200 µM de KCI. Se tomaron muestras de 1 ml del medio cada 30 minutos durante 5 h. El contenido de K<sup>+</sup> se determinó mediante un equipo de espectrofotometría de absorción atómica, Perkin-Elmer (Boston, MA) 5500.

## 1.2.3 EFECTO DEL AMONIO SOBRE LA ABSORCIÓN DE POTASIO

Se utilizaron plántulas de chile habanero de 45 días de edad cultivadas como se describe en el apartado 1.2.1. Para estudiar el efecto del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la toma de K<sup>+</sup> se utilizó como fuente el NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Las plántulas crecieron en ausencia de K<sup>+</sup> por tres días y después se transfirieron a una solución H<sup>1</sup>/<sub>5</sub> sin K<sup>+</sup>, posteriormente se suplementaron con 50 y 100µM de KCl, en presencia de 0, 0.25, 0.5 y 1 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Se tomaron alícuotas del medio cada 30 min durante un periodo de 5 h. El K<sup>+</sup> se determinó como se describe en el apartado 1.2.2.

# 1.2.4 ABSORCIÓN DE POTASIO EN PRESENCIA DE BLOQUEADORES DE CANALES

Plántulas de 45 días de edad cultivadas como se describe en el apartado 1.2.1, fueron empleadas para estudiar el efecto de los bloqueadores de canales de K<sup>+</sup> sobre la toma de K<sup>+</sup>. Éstas plántulas fueron mantenidas en ausencia de K<sup>+</sup> durante tres días y después se transfirieron a una solución H<sup>1</sup>/<sub>5</sub> sin K<sup>+</sup>, posteriormente fueron re suplementadas con 50 y 100  $\mu$ M de KCl, en presencia de 0, 10 y 20 mM de CsCl y TEA, respectivamente. Se tomaron alícuotas del medio cada 30 min por 5 h y las concentraciones de K<sup>+</sup> se determinaron como se describe en el apartado 1.2.2.

A continuación se presentan los resultados de este trabajo en el artículo publicado.

African Journal of Biotechnology Vol. 10(62), pp. 13418-13429, 12 October, 2011 Available online at http://www.academicjournals.org/AJB ISSN 1684–5315 © 2011 Academic Journals

Full Length Research Paper

# Effects of ammonium nitrate, cesium chloride and tetraethylammonium on high-affinity potassium uptake in habanero pepper plantlets (*Capsicum chinense* Jacq.)

José Ramón Pacheco-Arjona<sup>2#</sup>, Nancy Ruiz-Lau<sup>1#</sup>, Fátima Medina-Lara<sup>1</sup>, Yereni Minero-García<sup>1</sup>, Ileana Echevarría-Machado<sup>1</sup>, César De los Santos-Briones<sup>2</sup> and Manuel Martínez-Estévez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 # 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, 97200, México.

<sup>2</sup>Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 # 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, 97200, México.

#### Accepted 29 August, 2011

Potassium (K<sup>+</sup>) is an essential nutrient and the most abundant cation in plant cells. Plants have a wide variety of transport systems for K<sup>+</sup> acquisition that catalyze K<sup>+</sup> uptake across a wide spectrum of external K<sup>+</sup> concentrations and mediate K<sup>+</sup> movement within the plant, as well as its release into the environment. The KUP/HAK/KT transporter family plays a key role in K<sup>+</sup> homeostasis in plant cells. The present study demonstrates that habanero pepper plantlets have a clear pattern of K<sup>+</sup> uptake when resupplemented with K<sup>+</sup> after K<sup>+</sup> starvation. Habanero pepper plantlets, re-supplemented with a solution containing low concentrations of K<sup>+</sup> after 72, 96 or 120 h of K<sup>+</sup> starvation were able to decrease the amount of K<sup>+</sup> in the solution at different time points. To study the effect of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, we added different concentrations of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> to the medium solution and demonstrated that NH<sub>4</sub><sup>+</sup> inhibited K<sup>+</sup> uptake in a dose-dependent manner. When the plantlets were subjected to K<sup>+</sup> starvation for 72 h and then resupplemented with 50 or 100 µM K<sup>+</sup>, exposure to K<sup>+</sup> channel blockers (10 mM CsCl and 20 mM TEA) decreased their K<sup>+</sup> uptake compared with the control treatment. A model demonstrating the process of K<sup>+</sup> uptake through an NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-insensitive component was proposed.

Key words: Potassium, high affinity transporters, channel blockers, ammonium.

### INTRODUCTION

Since the work of Knop and Sachs over 130 years ago, it has been known that plants cannot grow in the absence of potassium ( $K^*$ ) (Pfeffer, 1900).  $K^*$  is the second most

\*Corresponding author. E-mail: luismanh@cicy.mx. Tel: 52 999) 9428330 ext. 241. Fax: 52 (999) 9813900.

Abbreviations: CsCl, Cesium chloride; HAK, high-affinity potassium transporters; TEA, tetraethylammonium; HATS, high-affinity potassium system.

#These authors contributed equally to this work.

abundant inorganic cation in non-halophytes plants. As a major inorganic osmolyte, K<sup>+</sup> is essential for plant growth and consequently for crop production. Although, K<sup>+</sup> concentrations in soil solution are in the range of only 0.1 to 6 mM depending on soil type (Adams, 1971), plants are able to accumulate large amount of this element that constitutes 2 to 10% of plant dry weight (Leigh et al., 1984; Tisdale et al., 1993). Plant roots absorb K<sup>+</sup> at a wide range of external K<sup>+</sup> concentrations ([K<sup>+</sup>]<sub>ext</sub>), typically from 0.1 to 10 mM (Hawkesford and Miller, 2004). K<sup>+</sup> plays major biochemical and biophysical roles in plants (Szczerba et al., 2009). K<sup>+</sup> is involved in cell elongation, leaf movement, tropism, metabolic homeostasis, germination, seasonal changes and stomata opening/ closing;

it is also associated with numerous biochemical processes (Marschner, 1995; Szczerba et al., 2009). K<sup>+</sup> is present in all compartments of plant cells and enriched in two large pools: vacuole and cytosol. The role of K<sup>+</sup> in enzyme activation and protein biosynthesis is based on its high and stable concentration in the cytoplasm.  $K^{+}$ homeostasis in the cytoplasm is essential for metabolic processes; therefore, cytosolic K<sup>+</sup> concentrations are strictly controlled and maintained in a narrow range (around 100 mM) that is optimal for the function of cytosolic enzymes (Leigh et al., 1984; Maathuis and Sanders, 1996; Walker et al., 1996; Cuin et al., 2003). Vacuolar K<sup>+</sup> content is more variable, depending on K<sup>+</sup> availability and tissue type and is observed to be in the range of 20 to 200 mM (Leigh et al., 1984; Walker et al., 1996). Two major regulatory mechanisms are involved in maintaining K<sup>+</sup> homeostasis: K<sup>+</sup> flow across the plasma membrane and mobilization of vacuolar K<sup>+</sup> reserve (Fernando and Glass, 1992; Walker et al., 1996). The K<sup>+</sup> transport system in plants consists of low- and highaffinity components (Epstein et al., 1961). At the molecular level, these components conventionally refer to channels and transporters, respectively based on their different properties (Maathuis and Sanders, 1994, 1997). The presence of several types of K<sup>+</sup>-transporting membrane proteins has been reported, including K\* channels (Shaker-type K<sup>+</sup> channels), two pore channels (the KCO/TPK family), non-selective channels (CNGC), K<sup>+</sup> transporters (the HKT family, the KT/KUP/HAK family),  $K^{+}/H^{+}$  antiporters (KEA) and cation/ $H^{+}$  antiporters (CHX) (Maser et al., 2001, 2002; Ashley et al., 2006). KT/KUP/ HAK transporters, together with shaker-type K<sup>+</sup> channels, play a fundamental role in  $K^{\dagger}$  homeostasis in plant cells, involved in both high- and low-affinity K<sup>+</sup> uptake (Santa-Maria et al., 1997; Rigas et al., 2001; Elumalai et al., 2002; Vallejo et al., 2005). Previous evidence has suggested that these transporters are present in all plants (Kim et al., 1998; Rubio et al., 2000; Ahn et al., 2004) and have functions in the plasma membrane and tonoplast (Senn et al., 2001; Bañuelos et al., 2002). Reports have shown that the Arabidopsis genes encoding K<sup>+</sup> channels and transporters are directly regulated by external K<sup>+</sup> concentration, although, many of these genes have also been shown to be induced or repressed by stress and hormones (Pilot et al., 2003; Gierth et al., 2005). Very little is known about how the K<sup>+</sup> transport system and available supply are regulated and coordinated in plants. K<sup>+</sup> starvation is known to activate K<sup>+</sup> uptake in plants (Siddiqi and Glass, 1986; Benlloch et al., 1989; Kochian and Lucas, 1983; Fernando et al., 1990; Fernando and Glass, 1992; Maathius and Sanders, 1996; Shin and Schachtman, 2004). This activation has been conventionally associated with induction of the expression of high-affinity transporters and considered as a major mechanism of adaptation to K<sup>+</sup> starvation (Drew et al., 1984; Fernando et al., 1990).

Sensitivity to NH4<sup>+</sup> is an important feature of high-

affinity K<sup>+</sup> uptake; in Arabidopsis (Spalding et al., 1999), barley (Santa-Maria et al., 2000) and pepper (Martinez-Cordero et al., 2005), both NH4<sup>+</sup>-sensitive and NH4<sup>+</sup>insensitive components have been identified. The NH4+sensitive component is probably mediated by HAK1 transporters, whereas, in Arabidopsis, the NH4+insensitive component has been postulated to be mediated by the inward-rectifier K<sup>+</sup> channel AtAKT1, indicating that channels may be involved in high-affinity K<sup>+</sup> uptake in a range of K<sup>+</sup> concentrations (Hirsch et al., 1998; Spalding et al., 1999). NH4<sup>+</sup> is not only an important tool to study the K<sup>+</sup> transport system in plants but also used in fertilizers. The interactions between NH4<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> are very important for crop management, especially when K<sup>+</sup> concentration decreases or salinity increases.

Tetraethylammonium (TEA) is considered a specific blocker of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. Ba<sup>2+</sup> and Cs<sup>+</sup> inhibit K<sup>+</sup> uptake through most K<sup>+</sup> channels and some other transporters (Hedrich and Schroeder, 1989; Tester, 1990; Hille, 1992; Fu and Luan, 1998). According to the values of electrical distance, blockers can be classified as "surface" if they act at the entrance of the pore (toxins or quaternary ammonium ions in K<sup>+</sup> channels) and as "deep" if they deeply enter the pore by slowly passing a selective filter (for example, Na<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> in K<sup>+</sup> channels) (French and Shoukimas, 1985). The alkali cation Cs<sup>+</sup> acts as a K<sup>+</sup> analogue and is also toxic to plants (White and Broadley, 2000). It is well known that Cs<sup>+</sup> is a competitive inhibitor of K<sup>+</sup> and acts as a K<sup>+</sup> channel blocker (White and Broadley, 2000; Zhu and Smolders, 2000); Cs<sup>+</sup> accumulation in plants decreases with increasing K<sup>+</sup> concentration (Smolders et al., 1996; Tsukada et al., 2002). However, short-term K<sup>+</sup> starvation can increase Cs<sup>+</sup> influx, indicating the importance of internal and external K<sup>+</sup> status (Zhu and Smolders, 2000). Fu and Luan (1998) reported the inhibition of AtKUP1-mediated K<sup>+</sup> uptake by K<sup>+</sup> channel blockers, such as TEA, Cs<sup>+</sup>, and Ba<sup>2+</sup>. Consistent with a possible function in K<sup>+</sup> uptake from the soil, the AtKUP1 gene is primarily expressed in roots. Therefore, the authors concluded that the AtKUP1 gene product may function as a K<sup>+</sup> transporter in Arabidopsis roots over a broad range of concentration of K<sup>+</sup> in soil. Another possibility is that these inhibitors (including TEA) may block K<sup>+</sup> influx through other K<sup>+</sup> transporters aside from voltage-gated K<sup>+</sup> channels (Hille, 1992).

In pepper (Capsicum annum), it has been demonstrated that HAK1 transporters greatly contribute to the high-affinity K<sup>+</sup> uptake in roots (Martinez-Cordero et al., 2004, 2005). K<sup>+</sup> starvation in pepper plants promotes high-affinity K<sup>+</sup> uptake (K<sub>m</sub> of 6  $\mu$ M K<sup>+</sup>) that is very sensitive to ammonium (NH<sup>+</sup><sub>4</sub>); indeed, the high-affinity K<sup>+</sup> transporter (CaHAK1) is expressed in their roots. When expressed in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), CaHAK1 mediates high-affinity K<sup>+</sup> and Rb<sup>+</sup> uptake with K<sub>m</sub> values of 3.3 and 1.9  $\mu$ M, respectively. Rb<sup>+</sup> uptake can be competitively inhibited by micromolar concentrations of NH<sup>+</sup><sub>4</sub> and Cs<sup>+</sup> and by millimolar concentrations of Na<sup>+</sup> (Martinez-Cordero et al., 2004, 2005).

To date, functional characterization in pepper plants about structural and regulatory elements involved in K<sup>+</sup> uptake has only been conducted in C. annum (Martinez-Cordero et al., 2004, 2005; Rubio et al., 2000). Comparative studies in Capsicum will support its role as a model system to investigate the physiology of K<sup>+</sup> uptake in pepper. In addition, it could be important for studying K<sup>+</sup> nutrition of this crop under K<sup>+</sup>-limiting conditions and in the presence of abiotic stress. Consequently, intensive studies are necessary to elucidate the nature of the systems contributing to K<sup>+</sup> transport in pepper plants. Knowledge about the effects of K<sup>+</sup> starvation, K<sup>+</sup> resupplementation and K<sup>+</sup> uptake in pepper plants will allow more understanding of the roles of the K<sup>+</sup> transport system. To explore the relative contribution of the components involved in K<sup>+</sup> transport, we examined K<sup>+</sup> uptake under the conditions of K<sup>+</sup> starvation and K<sup>+</sup> resupplementation in habanero pepper plantlets, as well as the effects of NH<sup>+</sup><sub>4</sub>, CsCl and TEA on K<sup>+</sup> uptake by habanero pepper roots.

#### MATERIALS AND METHODS

#### **Plant materials**

Seeds of habanero pepper fruits (Capsicum chinense Jacq.) were used in this study. Disinfection was achieved under aseptic conditions. The seeds were surface-sterilized in 80% ethanol for 5 min followed by rinses in sterilized, distilled and deionized water for 4 min. Subsequently, 30% sodium hypochlorite was added and the seeds were imbibed for 15 min with continuous shaking and rinsed in sterile water. Finally, the seeds were left soaking in sterile water for 72 h and germinated in agrolite at 28°C. After seven days, the seedlings were placed in 600 ml plastic containers filled with a modified 1/5 (of its ionic strength) Hoagland solution (H1/5) containing both the macronutrients, including 1.2 mM KNO<sub>3</sub>, 0.8 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.2 mM MgSO<sub>4</sub> and the micronutrients, including 50 µM CaCl<sub>2</sub>, 12.5 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 µM MnSO4, 1 µM ZnSO4, 0.5 µM CuSO4, 0.1 µM Na2MoO4 2H2O, 0.1 µM NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O and 10 µM Fe-EDDHA. The plantlets were grown under conditions of photoperiod (16 h light/8 h dark) and air temperature of 20 and 25 °C, respectively. The relative humidity was 65% (day) and 85% (night). The nutrient solution was replaced weekly with fresh K\*-free solution (H1/5-K). In all experiments, 45days-old plantlets were used.

#### Physiological studies of K<sup>+</sup> uptake in pepper plantlets

#### K<sup>+</sup> depletion and K<sup>+</sup> uptake

For K<sup>+</sup> starvation treatment, plantlets were transferred into a K<sup>+</sup>-free nutrient solution (H1/5-K) and incubated for different time periods (0, 72, 96 and 120 h). This solution contained 1.4 mm Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.1 mM Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0.2 mM MgSO<sub>4</sub> and the micronutrients described earlier. After the incubation, the plantlets with a uniform size were selected and homogeneously weighed in groups of 15 plantlets. The plantlets roots were then rinsed with cold H1/5-K solution and at time zero, were transferred to 250 ml containers filled with the

same solution supplemented with 50, 100 or 200  $\mu$ M of KCI (K\*). Medium samples of 1 ml were obtained at intervals of 30 min and K\* concentration was determined by atomic absorption using a Perkin-Eimer 5500 spectrophotometer (Boston, MA, USA). Control plantlets were maintained in the K\*-containing nutrient solution described earlier (H1/5).

# Effect of the presence of NH4<sup>+</sup> or other K<sup>+</sup> channel blockers on K<sup>+</sup> uptake

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> was used as an NH<sub>4</sub><sup>+</sup> source. Plantlets were subjected to K<sup>+</sup> starvation for three days. Subsequently, the plantlets were transferred to the H1/5-K solution immediately re-supplemented with 50 or 100  $\mu$ M KCI (K<sup>+</sup>) and maintained in the presence of 0, 250, 500 or 1,000  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. For channel blocker treatment, after K<sup>+</sup> re-supplementation, the plantlets were maintained in the presence of 10 mM CsCl or 20 mM TEA. Medium aliquots (1 ml) were obtained at intervals of 30 min for 5 h and their K<sup>+</sup> concentrations were determined using a Perkin-Elmer 5500 spectrophotometer (Boston, MA, USA).

#### **RESULTS AND DISCUSSION**

#### K<sup>+</sup> uptake by habanero pepper roots

To evaluate the effect of K<sup>+</sup> starvation on K<sup>+</sup> uptake by pepper roots, the plantlet roots grown in the H1/5-K solution and maintained for different time periods were rinsed with the same cold solution and, at time zero, were transferred to containers filled with 250 ml of the H1/5-K solution supplemented with 50, 100 or 200 µM K<sup>+</sup>. The analysis of K<sup>+</sup> uptake in a solution containing 50 µM K<sup>+</sup> showed a decrease of the K<sup>+</sup> concentration in the solution, indicating that the plantlet roots were capable of absorbing external K<sup>+</sup>; this uptake was dependent on the duration of the K<sup>+</sup> starvation treatment. The plantlets subjected to K<sup>+</sup> starvation for 72 h exhibited an increased K<sup>+</sup> uptake, whereas the plantlets subjected to K<sup>+</sup> starvation for 96 h showed low K<sup>+</sup> uptake that was not significantly different from that in control plantlets (Figure 1a). The net K<sup>+</sup> uptake, calculated as the difference between total uptake (the amount of K<sup>+</sup> depleted from the solution) and total release (the amount of K<sup>+</sup> increased in the solution), was approximately five times higher in the plantlets treated with K<sup>+</sup> starvation for 72 h than that in the control plantlets growing in the K<sup>+</sup>-containing medium, when they were both supplemented with 50 µM K<sup>+</sup> (Table 1). However, there was no net K<sup>+</sup> uptake in the plantlets treated with K<sup>+</sup> starvation for 96 h. Regardless of the duration of K<sup>+</sup> starvation that the plantlets were subjected to, the total K<sup>+</sup> uptake under these conditions was between 5 and 8 µM; there were no significant differences among the treatments (Table 1). The net adsorption in the plantlets treated with K<sup>+</sup> starvation for 96 h and that in the control plantlets were much less than the total uptake, suggesting that K<sup>+</sup> was released into the medium solution under these conditions. This phenomenon was not observed in the plantlets treated with K\*



**Figure 1.** Effect of K<sup>+</sup> starvation on high-affinity K<sup>+</sup> uptake. Plantlets were grown in the H1/5 solution (1.4 mM K<sup>+</sup>) for 45 days and then transferred to a K<sup>+</sup>-free solution for 0 h (close circles), 72 h (open circles), 96 h (close triangles) or 120 h (open triangles). Subsequently, KCI was added to the medium solution as a K<sup>+</sup> source to a concentration of 50  $\mu$ M (A), 100  $\mu$ M (B) or 200  $\mu$ M (C). Samples of medium solution were obtained at different time points; K<sup>+</sup> content was determined. Data represent the mean ± standard deviations of three independent experiments, n = 3.

Table 1. Total and net K<sup>+</sup> uptake in habanero pepper plantlets. The plantlets were grown in the H1/5 solution (1.4 mM K<sup>+</sup>) for 45 days and transferred to the H1/5-K solution for 0, 72, 96 and 120 h.

	K <sup>+</sup> uptake ([KCI] µmole)						
Treatment	50		100		200		
	Total uptake	Net uptake	Total uptake	Net uptake	Total uptake	Net uptake	
⊦ K*							
0 h	6.01±0.53	1.54±0.22	22.61±8.76	14.01±6.72	14.67±4.01	11.33±0.74	
· K*							
72 h	8.36±0.73	7.22±0.21	22.19±1.89	19.70±3.86	20.04±1.00	13.89±0.49	
96 h	5.08±1.19	0.64±2.01	22.70±2.57	20.99±0.73	11.22±1.83	2.57±1.16	
120 h	N.A	N.A	20.13±0.53	20.04±0.51	17.64±2.93	5.99±2.27	

At time zero, KCI was added to the medium solution to a concentration of 50, 100 or 200  $\mu$ M. K<sup>+</sup> content was measured as described in materials and methods. K<sup>+</sup> content is expressed in micromole. Data represent the mean ± standard deviations of three independent experiments, n = 3.

starvation for 72 h (Table 1). Maathuis and Sanders (1996) reported K<sup>+</sup> uptake at concentrations less than 1 µM in several species, whereas Sheahan et al. (1993) noted K<sup>+</sup> uptake at 50 to 100 µM concentrations. Borges et al. (2006) suggested a demand for K<sup>+</sup> uptake when habanero pepper plantlet roots were imbibed in a solution at a K<sup>+</sup> concentration higher than 89 µM. To prevent endogenous K<sup>+</sup> released from the plants to external solution, K<sup>+</sup> concentrations should be above 89 µM. In this study, we observed K<sup>+</sup> uptake at 50 µM K<sup>+</sup> without K<sup>+</sup> releasing into the medium solution, particularly with the 72-h K<sup>+</sup> starvation treatment. This result contradicts a previous finding reported by Borges et al. (2006). Our work is in agreement with the report of Martinez-Cordero et al. (2005) showing that C. annuum plants treated with K<sup>+</sup> starvation for 2 to 8 h and subsequently re-supplemented with 50 µM K<sup>+</sup> did not exhibit K<sup>+</sup> uptake, whereas in the plants treated with K<sup>+</sup> starvation for more than 24 h, K<sup>+</sup> uptake was observed; furthermore, with K<sup>+</sup> starvation for a longer time, more K<sup>+</sup> uptake was noted.

When the seedlings treated with K<sup>+</sup> starvation for different time periods were placed in the presence of 100 µM K<sup>+</sup>, a significant reduction of K<sup>+</sup> was observed in the medium solution, suggesting a K<sup>+</sup> uptake by the plantlets roots (Figure 1b). There was a tendency for higher K<sup>+</sup> uptake in the plantlets subjected to K<sup>+</sup> starvation after 90 min of K<sup>+</sup> exposure (Figure 1b). There were no significant differences between the net K<sup>+</sup> uptake by the K<sup>+</sup>-resupplemented plantlet roots and the control plantlets subjected to K<sup>+</sup> starvation (20 and 14 µM, respectively; Table 1). Under this condition (100 µM K<sup>+</sup>), we did not observe a significant K<sup>+</sup> release into the medium solution, evidenced by the result that the net uptake was similar to the total uptake in all the treatments (Table 1). The K<sup>+</sup> uptake in the plantlets exposed to 100 µM K<sup>+</sup> was higher compared with that in the plantlets exposed to 50 µM K<sup>+</sup> (Figure 1a). Similar results have been reported in C. annuum plants (Martinez-Cordero et al., 2005). Furthermore, the plantlets treated with K<sup>+</sup> starvation for 72 h

showed an increased K<sup>+</sup> uptake when transferred to the medium solution with 200  $\mu$ M K<sup>+</sup> (Figure 1c). The net K<sup>+</sup> uptake was higher with 72-h K<sup>+</sup> starvation (13.89 ± 0.49  $\mu$ M), significantly different from that in the control plantlets (11.33 ± 0.74  $\mu$ M) (Table 1). It is noteworthy that with the 96 and 120 h K<sup>+</sup> starvation treatments, the net K<sup>+</sup> uptake was significantly reduced compared with that in the control plantlets and this value was much lower than the total K<sup>+</sup> uptake value under every condition, indicating that K<sup>+</sup> was released into the medium solution (Table 1). In general, with 200  $\mu$ m K<sup>+</sup> re-supplementation, the K<sup>+</sup> uptake decreased compared with 100  $\mu$ m K<sup>+</sup> re-supplementation, may affect the activity of K<sup>+</sup> high-affinity uptake.

#### Effect of NH4<sup>+</sup> on K<sup>+</sup> uptake

We used 45-day-old habanero pepper plantlets to study the effect of NH4<sup>+</sup> on K<sup>+</sup> uptake. The experimental conditions were 72 h K\* starvation followed by a resupplementation with 50 or 100 µM K<sup>+</sup>. These conditions were chosen because with 72 h K<sup>+</sup> starvation and the resupplementation with 50 µM K<sup>+</sup>, the net K<sup>+</sup> uptake by the roots was significantly higher than that with the control treatment, and this was the only treatment without inducing a K<sup>+</sup> release, whereas the 72 h K<sup>+</sup> starvation followed by 100 µM K<sup>+</sup> re-supplementation caused a K<sup>+</sup> release into the solution. Under these conditions (100 µM), the net K<sup>+</sup> uptake was higher than that with the other treatments (50 and 200 µM). Thus, habanero pepper plantlets treated with 72 h K<sup>+</sup> starvation and subsequently placed in a solution containing 50 µM K<sup>+</sup> in the presence of 250, 500 or 1,000 µM of NH4+ showed a significant reduction in K<sup>+</sup> uptake (Figure 2a). Exposure of the plantlets to a low concentration (250 µM) of NH4<sup>+</sup> reduced the K<sup>+</sup> content in the solution during the first 30 min, indicating a K<sup>+</sup> uptake during t his period (Figure 2a).

However, from 30 min to 3 h, there was a slight increase



**Figure 2.** Effect of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on high-affinity K<sup>+</sup> uptake. Plantlets were grown in the H1/5 solution (1.4 mM K<sup>+</sup>) for 45 days and then transferred to a K<sup>+</sup>- and nitrogen-free solution supplemented with 50  $\mu$ M K<sup>+</sup> (A) or 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> (B), together with 250  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (open circles), 500  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (close triangles) or 1 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (open triangles), using NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> as a nitrogen source. Samples of medium solution were obtained at different time points; K<sup>+</sup> content was determined. Data represent the mean ± standard deviation of three independent experiments, n = 3.

in K<sup>+</sup> concentration in the solution, indicating a K<sup>+</sup> release from the roots. After 3 h, there was a more significant K<sup>+</sup> decrease in the solution. With the treatment of 500 or 250  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, the observation was similar, at early time points, K<sup>+</sup> concentration in the solution increased (indicating a K<sup>+</sup> release), whereas at later time points, K<sup>+</sup> concentration decreased or remained constant, indicating a small K<sup>+</sup> influx (Figure 2a). When NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration increased to 1,000  $\mu$ M, an increase in K<sup>+</sup> concentration was observed in the solution for 5 h, indicating a K<sup>+</sup> release. As shown in Table 2, there was a reduction in the total K<sup>+</sup> uptake in those plantlets exposed to 50  $\mu$ M K<sup>+</sup> in the presence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> compared with that in controls. This reduction was NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dose-dependent. The net K<sup>+</sup> uptake was reduced by over 60% in the plantlets exposed to 250  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup> compared with that in controls and higher doses of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> led to a 100% inhibition of the net K<sup>+</sup> uptake, significantly favoring a K<sup>+</sup> release from the roots.

When plantlets were treated with K<sup>+</sup> starvation for 72 h followed by 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> re-supplementation in the presence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> at different concentrations, the effect of K<sup>+</sup> uptake inhibition was significant compared with the control plantlets (Figure 2b). There was a K<sup>+</sup> release into

	K <sup>+</sup> uptake ([KCl] µmole)						
Parameter	50		100				
	Total uptake	Net uptake	Total uptake	Net uptake			
Control	8.36±0.73	7.22±0.21	22.19±1.89	19.70±3.86			
[NH₄NO₃] µM							
250	6.07±1.92	2.69±2.07	7.69±1.57	-5.43±0.01			
500	2.14±0.45	-0.04±0.70	12.39±3.48	-0.91±0.81			
1000	0.94±0.59	-4.29±0.47	0.28±0.15	-0.03±0.02			
CsCl 10 mM	2.21±1.73	-16.19±2.39	8.35±5.9	-5.52±3.89			
TEA 20 mM	4.44±0.70	-6.42±0.47	21.36±0.25	9.72±2.11			

**Table 2.** Total and net K<sup>+</sup> uptake in habanero pepper plantlets in the presence of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, CsCl and TEA. Plantlets were grown in the H1/5 solution (1.4 mM K<sup>+</sup>) for 45 days and transferred to the H1/5-K solution for 72 h.

At time zero, KCI was added to the medium solution to a concentration of 50, 100, or 200  $\mu$ M. K<sup>+</sup> content was measured as described in "Materials and Methods". K<sup>+</sup> content is expressed in micromole. Data represent the mean ± standard deviations of three independent experiments, n = 3.



**Figure 3.** Dose-response curve of total K<sup>+</sup> uptake to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> treatment. Roots treated with K<sup>+</sup> starvation for 72 h were exposed to different concentrations of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (250, 500, or 1,000  $\mu$ M) in the presence of 50  $\mu$ M K<sup>+</sup> (o) or 100  $\mu$ M (o) K<sup>+</sup>. Medium aliquots (1 ml) were obtained after 5 h; K<sup>+</sup> content was determined. Data represent the mean ± standard deviation of three independent experiments, n = 3.

the solution at the end of the evaluation period, which was increased in the presence of 250 or 500  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Also, the plantlets exposed to 100  $\mu$ m K<sup>+</sup> in the presence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> for 5 h showed a significant reduction in total K<sup>+</sup> uptake; this reduction was observed with both doses of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> treatment (250 and 1000  $\mu$ M) (Table 2). Under these conditions, a net K<sup>+</sup> uptake did not occur; on the

contrary, we observed a significant  $K^*$  release into the solution.

Plotting total K<sup>+</sup> uptake versus NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration, we observe that the total K<sup>+</sup> uptake of the plantlets treated with 50  $\mu$ M K<sup>+</sup> reduced completely in a dose-dependent manner (Figure 3); treatment of 340  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup> induced an approximately 50% inhibition of K<sup>+</sup> uptake. However, a

different effect was shown with the treatment of 100  $\mu$ M K<sup>+</sup>: in this case, we observed a more significant reduction (over 60% inhibition) in total K<sup>+</sup> uptake in the plantlets exposed to 250  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, whereas NH<sub>4</sub><sup>+</sup> treatment between 250 and 500  $\mu$ M did not cause an increased inhibition, suggesting the presence of alternative transportation systems that are not sensitive to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. However, with an even higher dose of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (1,000  $\mu$ M), the total K<sup>+</sup> uptake were completely inhibited (Figure 3). It is necessary to note that with the 50  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup> treatment, we did not observe a reduction in K<sup>+</sup> uptake (Figure 3).

Many studies have reported that K<sup>+</sup> influx mediated by high-affinity transport systems can be severely inhibited by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Scherer et al., 1984; Vale et al., 1987; 1988a, b; Wang et al., 1996; Spalding et al., 1999; Santa-Maria et al., 2000; Bañuelos et al., 2002, Kronzucker et al., 200; Martinez-Cordero et al., 2004; Szczerba et al., 2006, 2008 a, b; Nieves-Cordones et al., 2007). The mechanism by which NH<sub>4</sub><sup>+</sup> inhibits K<sup>+</sup> influx through high-affinity transporters has not been firmly established. However, it could be due to the direct competition between NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport systems (Vale et al., 1987; Wang et al., 1996; White, 1996; Britto and Kronzucker, 2002, 2008).

The plantlet response to 100 µM K<sup>+</sup> observed in this work could be explained by the results from previous studies. Buschmann et al. (2000) reported an increase in the AKT1 gene transcript when  $K^{+}$  was eliminated in wheat plants, suggesting that K<sup>+</sup> channels may play an important role in K<sup>+</sup> uptake. Electrophysiological studies have shown that a NH4+-insensitive component is specific for Shaker K<sup>+</sup> channel (Bertl et al., 1995; White, 1996; Hirsch et al., 1998; Moroni et al., 1998; Spalding et al., 1999; Szczerba et al., 2008b). Finally, the differential NH4<sup>+</sup> susceptibility between high- and low-affinity transport systems demonstrates the ability of AKT1 to mediate high-affinity K<sup>+</sup> transport because high-affinity K<sup>+</sup> transport systems can be inhibited by NH4<sup>+</sup> treatment in Arabidopsis thaliana; additionally, an Akt1 mutant exhibited growth inhibition at low K<sup>+</sup> concentrations, whereas wild-type plants were less affected, indicating that AKT1 acts in response to K<sup>+</sup> concentration change through high-affinity K<sup>+</sup> transport systems (Hirsch et al., 1998; Spalding et al., 1999). According to our results, we propose a model to explain the behavior of  $K^{+}$  uptake by habanero pepper roots in the presence of NH4<sup>+</sup>. In the presence of 50 µM K<sup>+</sup> and 250 or 500 µM NH4<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> uptake by the roots is inhibited by NH4<sup>+</sup>. Thus, highaffinity  $K^{\dagger}$  transporters are highly sensitive to  $NH_4^{\dagger}$ . whereas the low-affinity K<sup>+</sup> transport system is inactive when  $K^+$  concentration is too low; the low-affinity  $K^+$ transport system requires K<sup>+</sup> concentrations higher than 50  $\mu$ M to be activated (Figure 4a, b). In fact, when K<sup>+</sup> concentrations are increased to 100 µM in the presence of 250 or 500 µM of NH4<sup>+</sup>, an increase in K<sup>+</sup> uptake occurs through a NH₄<sup>+</sup>-insensitive K<sup>+</sup> transport system as shown in Figure 4c. When NH4<sup>+</sup> concentration increased (500 μM), K<sup>+</sup> uptake increased (Figure 4d); previous

evidence also suggest the presence of a  $NH_4^+$ -insensitive  $K^+$  transport system mediated by AKT1 channels (Gierth and Masser, 2007).

#### Effect of CsCl and TEA on K<sup>+</sup> uptake

To study the mechanisms of high-affinity K<sup>+</sup> uptake in habanero pepper plantlet roots, we used two compounds: CsCl and TEA, which have been commonly used as K<sup>+</sup> channel blockers in animal and plant cells (Tester, 1990; Hille, 1992; Fu and Luan, 1998; Hong-Yan et al., 2006).

Plantlets treated with K<sup>+</sup> starvation for 72 h were then transferred to the solution containing 50  $\mu$ M K<sup>+</sup> and 10 mM CsCl. The K<sup>+</sup> uptake was higher during the first 30 min compared with that in the control plantlets. However, the K<sup>+</sup> content increased in the solution, indicating a K<sup>+</sup> release from the roots. This release peaked at 5 h (Figure 4a). Total K<sup>+</sup> uptake by the roots during this period was inhibited by over 70%; no net uptake was observed and a high K<sup>+</sup> release into the solution was observed (Table 2).

These results suggest that in the plantlets treated with 10 mM CsCl, a K<sup>+</sup> uptake occurred 150 min after the treatment and the plantlets released endogenous K<sup>+</sup> that they contained before the treatment. Our results are in agreement with the previous observation by Hong-Yan et al. (2006) showing that in the rice roots treated with 30 mM CsCl and 0.25 mM K<sup>+</sup> for 3 h, the K<sup>+</sup> content decreased from 5.41 x 10<sup>-4</sup> mol. g<sup>-1</sup> dry weight to 4.99 x 10<sup>-4</sup> mol. g<sup>-1</sup> dry weight.

By analyzing K<sup>+</sup> uptake in the solution containing 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> in the presence of 10 mM CsCl, we observed that K<sup>+</sup> was initially released and then K<sup>+</sup> uptake was maintained at a stable level (Figure 4b); total K<sup>+</sup> uptake in the treated plantlets was inhibited by 62% (8.35 ± 5.90  $\mu$ M K<sup>+</sup>) compared with that in the control plantlets (22.19 ± 1.89  $\mu$ M K<sup>+</sup>) and the net K<sup>+</sup> uptake value was negative because of the observed K<sup>+</sup> release into the solution (5.52 ± 3.89  $\mu$ M; Figure 4b; Table 2). The K<sup>+</sup> release of the 100  $\mu$ M K<sup>+</sup>-treated plantlets was lower than that of the 50  $\mu$ M K<sup>+</sup>-treated plantlets.

Regarding the effect of TEA on high-affinity K<sup>+</sup> uptake, we observed an initial K<sup>+</sup> uptake in the plantlets treated with K<sup>+</sup> starvation for 72 h and subsequently, transferred to the solution with 50  $\mu$ M K<sup>+</sup> in the presence of 20 mM TEA; however, after 3 h, there was a significant K<sup>+</sup> release peaking at 5 h (Figure 4a). Total K<sup>+</sup> uptake was reduced by almost 50% compared with that in the control; the release was higher than the influx; therefore, negative values were obtained for the net K<sup>+</sup> uptake (Table 2).

Furthermore, when the solution with 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> and 20 mM TEA was used, a K<sup>+</sup> release was observed during the first 30 min, as well as an increased K<sup>+</sup> uptake in relation to time; this pattern sustained for 150 min and K<sup>+</sup> uptake was maintained at the same level until 300 min (Figure 4b). The TEA-treated plantlets exhibited a 4% inhibition in total K<sup>+</sup> uptake (21.36 ± 0.25  $\mu$ M of K<sup>+</sup>) compared with the



**Figure 4.** Effect of K<sup>+</sup> transport blockers on K<sup>+</sup> uptake. Plantlets were grown in the H1/5 solution (1.4 mM K<sup>+</sup>) for 45 days and then were transferred to the H1/5-K solution re-supplemented with 50  $\mu$ M K<sup>+</sup> (A) or 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> (B), together with 10 mM CsCl (open circles) or 20 mM TEA (closed circles). Samples of medium solution were taken at different time points, K<sup>+</sup> content was determined. Data represent the mean ± standard deviation of three independent experiments, n

control plantlets (22.19  $\pm$  1.89  $\mu$ M of K<sup>+</sup>); the net K<sup>+</sup> uptake of the treated plantlets was 9.72  $\pm$  2.11  $\mu$ M, 51% lower than that of the control plantlets (19.70  $\pm$  3.86  $\mu$ M) (Figure 4b; Table 2). Ketchum and Poole (1990) previously mentioned that TEA, apparently, is a very ineffective K<sup>+</sup> blocker in plant cells. This view has not changed in recent years. In agreement with this view, Hong-Yan et al., (2006) did not find any significant difference in K<sup>+</sup> uptake in the rice plants exposed to 0.25

mM K<sup>+</sup> and 30 mM TEA; however, there are reports about electrophysiological studies on plant cells demonstrating an inhibition of K<sup>+</sup> uptake in the plants exposed to TEA (Wegner et al., 1994). Our results are different from the reports from Ketchum and Poole (1990) and Hong-Yan et al. (2006), in habanero pepper plantlets, an inhibition of K<sup>+</sup> uptake in the presence of TEA was observed. This inhibition could occur through a dual uptake system. It was reported that AKT1 channels may mediate K<sup>+</sup> trans-



**Figure 5.** Model illustrating the behavior of K<sup>+</sup> uptake by habanero pepper roots in the presence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. In roots exposed to 50  $\mu$ M K<sup>+</sup> in the presence of 250  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (A) or 500  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (B), K<sup>+</sup> uptake was inhibited by NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. High-affinity K<sup>+</sup> transporters were highly sensitive to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and the low-affinity K<sup>+</sup> transport system was inactive when K<sup>+</sup> concentration was too low. In roots exposed to 100  $\mu$ M K<sup>+</sup> in the presence of 250  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (C) or 500  $\mu$ M NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (D), K<sup>+</sup> uptake increased through a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-insensitive K<sup>+</sup> transport system. When NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration increased (500  $\mu$ M), K<sup>+</sup> uptake also increased.

port at the similar level as a high-affinity transporter does (Hirsch et al., 1998, Spalding et al., 1999).

In conclusion, we proposed a model to explain the behavior of K<sup>+</sup> uptake by habanero pepper roots in the presence of NH4<sup>+</sup>. When the roots were exposed to 50 μM K<sup>+</sup>, together with 250 or 500 μM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup> uptake was inhibited by NH4<sup>+</sup> at both concentrations, due to the fact that high-affinity K<sup>+</sup> transporters are highly sensitive to NH4<sup>+</sup> and this K<sup>+</sup> concentration was too low to activate the low-affinity K<sup>+</sup> uptake system (Figure 5a, b). However, when K<sup>+</sup> concentration increased to 100 µM in the presence of the same concentrations of NH4+, K+ uptake increased (Figures 5c, d and 3), possibly by activating a K<sup>+</sup> uptake system that is insensitive to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and to K<sup>+</sup> concentrations above 50 µM. When the NH4<sup>+</sup> concentration increased to 500 µM, K<sup>+</sup> uptake also increased, indicating the presence of a NH4+-insensitive K+ uptake system mediated by AKT1 channels. These results are in agreement with the results from Santa-Maria et al. (2000) showing that at low external Rb<sup>+</sup> concentrations, an NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-

sensitive component dominates Rb<sup>+</sup> uptake in plants grown in the absence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, whereas Rb<sup>+</sup> uptake preferentially occurs through an NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-insensitive pathway in plants grown at high external NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations. Previous studies have suggested that members of three alkali cation transporter families are likely to be involved in K<sup>+</sup> transport into the root cytoplasm from micromolar K<sup>+</sup> concentrations: AKT1 (Sentenac et al., 1992), HKT1 (Schachtman and Schroeder, 1994; Rubio et al., 1995) and the HAK-Kup transporters HvHAK1 and At-Kup1 (Santa-Maria et al., 1997; Fu and Luan, 1998; Kim et al., 1998).

An insertional mutant line of AKT1 has been identified in Arabidopsis; it exhibits a conditional capacity to grow at micromolar K<sup>+</sup> concentrations (Hirsch et al., 1998). This finding indicates that at least in some environments, the AKT1 inward-rectifier K<sup>+</sup> channel could be involved in K<sup>+</sup> transport into Arabidopsis from low K<sup>+</sup> concentration environment. Interestingly, AKT1 plants are unable to grow at low external K<sup>+</sup> concentrations unless NH<sub>4</sub><sup>+</sup> is present at millimolar concentrations in the growth medium, indicating the presence of other parallel  $NH_4^+$ -sen-sitive K<sup>+</sup> transport pathways.

NH4<sup>+</sup>-resistant K<sup>+</sup> transport through channels may occur at a low external concentration of K<sup>+</sup> in rice. It has been shown by Spalding et al. (1999) that in Arabidopsis, 55 to 63% of K<sup>+</sup> permeability in the high affinity transport systems HATS range can be mediated by AKT1, a channel believed to be the dominant mediator of lowaffinity K<sup>+</sup> transport (Gierth and Maser, 2007). This contribution may be even higher in rice, particularly under the conditions in the presence of NH4<sup>+</sup>, as suggested by Rodriguez-Navarro and Rubio (2006). Moreover, it has been shown that membrane potentials in rice are typically much less negative than those in Arabidopsis, particularly when rice is grown in the presence of NH4<sup>+</sup>, which causes permanent membrane depolarization in rice (Britto et al., 2001). Furthermore, NH4<sup>+</sup> may promote gene expression of high-affinity K<sup>+</sup> transporters in rice, as previously shown with LeHAK5 in tomato plants (Nieves-Cordones et al., 2007). Conversely, NH4+ may reduce the expression of HAK/KUP/KT transporters in rice, as previously observed in Arabidopsis and pepper plants (Martinez-Cordero et al., 2005).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant no. 24572/ 50625-Z and through a scholarship to NRL (205076) and JRPA (211981) by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of Mexico.

#### REFERENCES

- Adams F (1971). Soil solution. In EW Carson, ed., The Plant Root and its Environment. University Press of Virginia, Charlottesville, VA. pp. 441-481.
- Ahn SJ, Shin R, Schachtman DP (2004). Expression of KT/KUP genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K<sup>+</sup> uptake. Plant Physiol. 134: 1135–1145.
- Ashley MK, Grant M, Grabov A (2006). Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. J. Exp. Bot. 57: 425-436.
- Bañuelos MA, Garciadeblas B, Cubero B, Rodríguez-Navarro A (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. Plant Physiol. 130: 784-795.
- Bertl A, Anderson JA, Slayman CL, Gaber RF (1995). Use of Saccharomyces cerevisiae for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins characterization of KAT1, an inward rectifying K<sup>+</sup> channel from Arabidopsis thaliana, and comparison with endogenous yeast channels and carriers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 2701-2705.
- Benlloch M, Moreno I, Rodriguez-Navarro A (1998). Two modes of rubidium uptake in sunflower plants. Plant Physiol. 90: 939-942.
- Borges-Gómez L, Chuc-Puc J, Escamilla-Bencomo A, Medina-Lara F (2006). Kinetic of potassium absorption by habanero chili (*Capsicum chinense*) roots. Agrociencia. 40: 431-440.
- Britto DT, Siddiqi MY, Glass ADM, Kronzucker HJ (2001). Futile transmembrane NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. Proceed. National Aca. Sci. USA, 98: 4255-4258.

- Britto DT, Kronzucker HJ (2002). NH4<sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. J. Plant Physiol. 159: 567–584.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. Physiol. Plant. 133: 637-650.
- Buschmann PH, Vaidyanathan R, Gassmann W, Schroeder JI (2000). Enhancement of Na<sup>+</sup> uptake currents, time-dependent inwardrectifying K<sup>+</sup> channel currents, and K+ channel transcripts by K<sup>+</sup> starvation in wheat root cells. Plant Physiol. 122: 1387-1397.
- Cuin TA, Miller AJ, Laurie SA, Leigh RA (2003). Potassium activities in cell compartments of salt grown barley leaves. J. Exp. Bot. 54: 657-661.
- Drew MC, Saker LR (1984). Uptake and long distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to internal ion concentrations in barley: evidence of non allosteric regulation. Planta, 160: 500-507.
- Elumalai RP, Nagpal P, Reed JW (2002). A mutation in the *Arabidopsis* KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. Plant Cell. 14: 119-131.
- Epstein E, Rains DV, Elzam OE (1961). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. Proceed. Natl. Acad. Sci. USA. 49: 684-692.
- Fernando M, Kulpa J, Siddiqi MY, Glass ADM (1990). Potassium dependent changes in the expression of membrane associated proteins in barley roots. 1. Correlations with K<sup>+</sup> (<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>) influx and root K<sup>+</sup> concentration. Plant Physiol. 92: 1128-1132.
- Fernando M, Glass AJM (1992). Homeostatic processes for the maintenance of the K\* content of plant cells: a model. Israel J. Bot. 41: 145-166.
- French RJ, Shoukimas, JJ (1985). An ion's view of the potassium channel. The structure of the permeation pathway as sensed by a variety of blocking ions. J. Gen. Physiol. 85: 669-698.
- Fu HH, Luan S (1998). AtKUP1: a dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from Arabidopsis. Plant Cell. 10: 63-73.
- Gierth M, Masser P, Schroeder JI (2005). The potassium transporter AtHAK5 functions in K\* deprivation-induced high-affinity K\* uptake and AKT1 K\* channel contribution to K\* uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. Plant Physiol. 137: 1105-1114.
- Gierth M, Maser P (2007). Potassium transporters in plants involvement in K<sup>+</sup> acquisition, redistribution and homeostasis. FEBS Lett. 581: 2348-2356.
- Hawkesford MJ, Miller AJ (2004). Ion-coupled transport of inorganic solutes. In: Blatt, M.R., ed. Membrane transport in plants: annual plant reviews, Oxford: Blackwell Pub. Td. 15: 105-134.
- Hedrich R, Schroeder JI (1989). The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plant cells. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 539-569.
- Hille B (1992). Ionic channels of excitable membranes. Sunderland: Sinauer Associates Inc.
- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. Science, 280: 918-21.
- Hong-Yan L, Wei-Ning S, Wei-Ai S, Zhang-Cheng T (2006). Coregulation of water channels and potassium channels in nce. Physiol. Plant. 128: 58–69.
- Kim EJ, Kwak JM, Uozumi N, Schroeder JI (1998). AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high affinity potassium transport activity. Plant Cell. 10: 51-62.
- Ketchum K, Poole RJ (1990). Pharmacology of the Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel in corn protoplasts. FEBS. 274: 115-118.
- Kronzucker HJ, Szczerba MW, Britto DT (2003). Cytosolic potassium homeostasis revisited: <sup>42</sup>K-tracer analysis in *Hordeum vulgare* L. reveals set-point variations in [K<sup>1</sup>]. Planta, 217: 540–546.
- Kochian LV, Lucas WJ (1983). Potassium transport in corn roots. The significance of the root periphery. Plant Physiol. 73: 208–215.
- Maathuis FJM, Sanders D (1997). Regulation of K<sup>+</sup> absorption in plant root cells by external K<sup>+</sup>: interplay of different plasma membrane K<sup>+</sup> transporters. J. Exp. Bot. 48: 451-458.
- Maathuis FJM, Sanders D (1994). Mechanism of high affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. Proceed Natl. Acad. Sci. USA. 91: 9272-9276.
- Maathuis FJ, Sanders D (1996). Mechanism of potassium by higher plant root. Physiol. Plant. 96: 158-168.
- Marschner H (1995). Mineral nutrition of higher plants, 2<sup>nd</sup> ed. San

Diego: Acad. Press.

- Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K<sup>+</sup> transporter HAK1 of pepper. Plant Mol. Biol. 56: 413-421.
- Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F (2005). High-affinity K<sup>\*</sup> uptake in pepper plants. J. Exp. Bot. 416: 1553-1562.
- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. Plant Physiol. 126: 1646-1667.
- Maser P, Gierth M, Schroeder JI (2002). Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. Plant Soil. 247: 43-54.
- Moroni A, Bardella L, Thiel G (1998). The impermeant ion methyl ammonium blocks K<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub> <sup>+</sup> currents through KAT1 channel differently: evidence for ion interaction in channel permeation. J. Memb. Biol. 163: 25–35.
- Nieves-Cordones M, Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F (2007). An NH<sub>4</sub>\*-sensitive component dominates high-affinity K\* uptake in tomato plants. Plant Sci. 172: 273-280.
- Leigh RA, Wyn J, Jones RG (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. New Phytol. 97:1-13.
- Pfeffer W (1900). The physiology of plants. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press, Oxfort, UK. 1: p. 632.
- Pilot G, Gaymard F, Mouline K, Sentenac H (2003). Regulated expression of Arabidopsis shaker K<sup>+</sup> channel genes involved in K<sup>+</sup> uptake and distribution in the plant. Plant Mol. Biol. 51: 773-787.
- Rodriguez-Navarro A, Rubio F (2006). High affinity potassium and sodium transport systems in plants. J. Exp. Bot. 57: 1149-1160.
- Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI (1995). Sodium drive potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science, 270: 1660-1663.
- Rubio F, Santa-María GE, Rodríguez-Navarro A (2000). Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. Physiol. Plant. 109: 34-43.
- Rigas S, Debrosses G, Haralampidis K, Vicente-Agullo F, Feldmann KA, Grabov A, Dolan L, Hatzopoulos P (2001). TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. Plant Cell. 13: 139-151.
- Santa-Maria GE, Rubio F, Dubcovsky J, Rodriguez-Navarro A (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high affinity potassium transporter. Plant Cell. 9: 2281-2289.
- Santa-María GE, Danna CH, Czibener C (2000). High affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and -insensitive pathways. Plant Physiol. 123: 297-306.
- Schachtman DP, Schroeder JI (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. Nature, 370: 655-658.
- Scherer HW, Mackown CT, Leggett JE (1984). Potassium ammonium uptake interactions in tobacco seedlings. J. Exp. Bot. 35: 1060-1070.
- Senn ME, Rubio F, Bañuelos MA, Rodríguez-Navarro A (2001). Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. J. Biol. Chem. 276: 44563-44569.
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. Science. 256: 663-665.
- Sheahan JJ, Ribeiro-Neto L, Sussman MR (1993). Cesium intensitive mutants of Arabidopsis thaliana. Plant J. 3: 647-656.
- Shin R, Schachtman DP (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.101: 8827-8832.
- Siddiqi MY, Glass ADM (1986). A model for the regulation of K<sup>+</sup> influx, and tissue potassium concentrations by negative feedback effects upon plasmalemma influx. Plant Physiol. 81: 1-7.
- Spalding EP, Hirsch RE, Lewis DR, Qi Z, Sussman MR, Lewis BD (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity inhibition by ammonium and stimulation by sodium. J. Gen. Physiol. 113: 909-918.

- Smolders E, Kiebooms L, Buysse J, Merchkx R (1996). <sup>137</sup>Cs uptake in spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Tonic) at varying K supply. Plant Soil. 181: 205-209.
- Szczerba MW, Britto DT, Kronzucker HJ (2006). Rapid, futile K<sup>+</sup> cycling and pool-size dynamics define low-affinity potassium transport in barley. Plant Physiol. 141: 1494-507.
- Szczerba MW, Britto DT, Ali SA, Balkos KD, Kronzucker HJ (2008b). NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-stimulated and-inhibited components of K<sup>+</sup> transport in rice (*Oryza sativa* L.). J. Exp. Bot. 59: 3415-23.
- Szczerba MW, Britto DT, Kronzucker HJ (2009). K\* transport in plants: Physiology and molecular biology. J. Plant Physiol. 166: 447-466.
- Tisdale SL, Nelson WL, Beaton JD, Havlin JL (1993). Soil fertility and fertilizer. New York: Macmillan.
- Tester M (1990). Plant ion channels: whole-cell and single channel studies. New Phytol. 114: 305-340.
- Tsukada H, Hasegawa H, Hisamatsu S, Yamasaki S (2002). Transfer of <sup>137</sup>Cs and stable Cs from paddy soil to polished rice in Aomori, Japan. J. Environ. Radioact. \$9: 351-363.
- Vale FR, Jackson WA, Volk RJ (1987). Potassium influx into maize root systems influence of root potassium concentration and ambient ammonium. Plant Physiol. 84: 1416-1420.
- Vale FR, Jackson WA, Volk RJ (1988a). Nitrogen stimulated potassium influx into malze roots differential response of components resistant and sensitive to ambient ammonium. Plant Cell. Environ. 11: 493-500.
- Vale FR, Volk RJ, Jackson WA (1988b). Simultaneous influx of ammonium and potassium into maize roots kinetics and interactions. Planta, 173: 424–431.
- Vallejo AJ, Peralta ML, Santa-María GE (2005). Expression of potassium transporter coding genes, and kinetics of rubidium uptake, along a longitudinal root axis. Plant Cell. Environ. 28: 850-862.
- Wang MY, Siddiqi MY, Glass ADM (1996). Interactions between K<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: effects on ion uptake by rice roots. Plant Cell. Environ. 19: 1037-1046.
- Walker DJ, Leigh RA, Miller AJ (1996). Potassium homeostasis in vacuolated plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 10510-10514.
- Wegner LH, De Boer AH, Raschke K (1994). Properties of the K<sup>+</sup> inward rectifier in the plasma membrane of xylem parenchyma cells from barley roots: effects of TEA<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and La<sup>3+</sup>. J. Memb. Biol. 142: 363-379.
- White PJ (1996). The permeation of ammonium through a voltage independent K+ channel in the plasma membrane of rye roots. J. Memb. Biol. 152: 89-99.
- White PJ, Broadley MR (2000). Mechanisms of caesium uptake by plants. New Phytol. 147: 241-256.
- Zhu YG, Smolders E (2000). Plant uptake of radiocaesium a review of mechanism, regulation and application. J. Exp. Bot. 51: 1635-1643.