



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS**

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS
TRANSPORTADORES *OshKT1;3* Y *OshKT2;3* DE *Oryza
sativa***

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

Biol. Paul Rosas Santiago

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Omar H. Pantoja Ayala



CUERNAVACA, MORELOS, JUNIO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres que siempre están conmigo y me dan su apoyo incondicional.

Al laboratorio del Dr. Omar Pantoja por su gran ayuda en todo momento durante mi estancia en el laboratorio y por cada una de las aportaciones que en mucho me ayudaron a concluir esta tesis.

Gracias a la Dra Rosario Vera por su amistad y sus valiosos consejos fuera y dentro del laboratorio.

Gracias a la Dra Bronwym Barkla por su disposición presta en todo momento a ayudar.

Gracias al Dr Juan Estevez por sus consejos innovadores para este proyecto.

Gracias a la Dra Ivonne por cada una de sus ideas, sugerencias y aportaciones en este proyecto.

Gracias a Julio, Matilde, Josue, Alex, Dulce, Enrique, Jorge, Guadalupe, Martina y Toño compañeros y amigos con los cuales he pasado momentos de grata convivencia.

Al Dr Omar Pantoja que ha sido un buen tutor y un buen amigo.

A CONACyT por financiar este proyecto.

RESUMEN

Las plantas se enfrentan a una gran variedad de estreses tanto bióticos como abióticos. La producción de plantas con interés agrícola esta severamente afectada por la erosión de los suelos de cultivo que poseen un alto contenido de sales, principalmente NaCl. Varias estrategias emplean las plantas para poder contender a la salinidad: minimizar la entrada de sodio (Na^+) por las raíces, reducir la entrada de Na^+ al xilema para evitar su llegada a la parte aérea, o si ya se transporto a la parte aérea recircularlo por el floema hacia las raíces. Otras alternativas podrían ser, el secuestro del Na^+ dentro de organelos, como las vacuolas, por medio de antiportadores Na^+/H^+ o transportarlo hacia las hojas viejas, o incluso acumularlo en tejidos especiales como las células vejiga que están localizadas en la epidermis de las hojas (Tester y Davenpot, 2003).

El paso del ion Na^+ a través de las membranas celulares ocurre mediante proteínas de membrana especiales denominadas transportadores o canales iónicos. Recientemente se han propuesto a los transportadores de captura de alta afinidad pertenecientes a la familia HKT como partícipes en los mecanismos que proveen tolerancia a la salinidad. En *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* se ha sugerido que miembros de esta familia de transportadores juegan un papel importante en evitar que el Na^+ llegue a la parte aérea removiéndolo del xilema. Los HKT ortólogos en trigo se han propuesto que dirigen al Na^+ presente en la parte aérea hacia la cobertura de la hoja evitando así el alto contenido de Na^+ en la parte aérea de tal manera que la fotosíntesis y la síntesis proteica no se afectan. En *O. sativa* se identificaron 7 genes y 2 pseudogenes que codifican para transportadores HKT, sin embargo, solo en uno de ellos se pudo determinar su participación en la fisiología de la planta.

En el presente trabajo, se analizo las propiedades de transporte de OsHKT1;3 y OsHKT2;3 mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos en el sistema de *Xenopus laevis*. Los resultados obtenidos permiten proponer que OsHKT1;3 muestra una alta selectividad hacia Na^+ sobre el resto de los cationes alcalinos analizados, con una $K_m = 3.8 \pm 0.4$ mM y una $V_{max} = 418 \pm 11$ nA. Para

OsHKT2;3 las propiedades de transporte fueron diferentes ya que no mostró una selectividad hacia uno de los cationes alcalinos, clasificándolo como un transportador de cationes general. La localización de la expresión génica en tejidos de la raíz, la cobertura de la hoja y la hoja en arroz mostraron que *OsHKT1;3* se expresa en estos tres tejidos, mientras que *OsHKT2;3* se expresa solo en los dos últimos tejidos. Además se observó que la abundancia del transcrito en los tejidos anteriormente mencionados no se afecta por la ausencia de K^+ o la presencia de 30 mM de NaCl en cultivos hidropónicos de ambos transportadores.

Por otra parte, el empleo de diferentes sistemas de expresión heteróloga para la caracterización de las propiedades de transporte de varios canales/transportadores ha reflejado inconsistencias en la descripción de algunas proteínas. Esto nos llevó a la realización de plantas transgénicas en *A. thaliana* con el fondo genético mutante de *Athkt1;1*. El empleo de la mutante *Athkt1;1* se uso en primer lugar porque es una planta siendo así un sistema heterologo más cercano a arroz, segundo *A. thaliana* posee en su genoma solo un gen que codifica para la familia de transportadores HKT, mientras que en arroz hay 7 genes que codifican para la misma familia y tercero la transformación de *A. thaliana* es fácil, así como el ciclo de vida es corto en comparación con arroz. Se obtuvieron las transgénicas *pAthHKT1;1::OsHKT1;3* y *pAthHKT1;1::OsHKT2;3*. Con ello pretendemos usar a *A. thaliana* como un sistema de expresión heterólogo para confirmar las propiedades de transporte obtenidas en el sistema de los ovocitos de *X. laevis*.

Por sus propiedades de transporte, *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3*, podrían estar participando en regular el flujo del Na^+ en las células vegetales, no obstante la función fisiológica aun no es clara, sin embargo, nuestros resultados muestran que el transcrito de ambos transportadores esta presente en la parte aérea, llegándose a detectar solo el transcrito de *OsHKT1;3* en la raíz además que en ausencia de K^+ y presencia de 30 mM de NaCl sugiriendo que la regulación de la actividad de estos transportadores no es a nivel transcripcional.

ÍNDICE.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 EL PAPEL DEL K ⁺ y DEL Na ⁺ EN LA FISIOLÓGÍA VEGETAL.....	3
1.2 MECANISMOS DE TRANSPORTE DE K ⁺ Y Na ⁺	4
1.3 DISTRIBUCIÓN ANATÓMICA DE TRANSPORTADORES DE K ⁺ EN PLANTAS.....	5
1.4 FISIOLÓGÍA DE LOS HKT.....	7
1.5 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS HKT Y SELECTIVIDAD.....	9
1.6 FILOGENIA DE LAS PROTEÍNAS HKT.....	12
1.7 JUSTIFICACIÓN.....	12
2 OBJETIVO GENERAL.....	16
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	17
3.1.1 OBTENCIÓN Y DEFOLICULACIÓN DE LOS OVOCITOS.....	17
3.1.2 TRANSCRIPCIÓN IN VITRO DEL ADNc DE OsHKT1;3 Y OsHKT2;3.....	18
3.1.3 MICROINYECCIÓN DEL ARN DE OsHKT1;3 y OsHKT2;3 EN LOS OVOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	19
3.1.4 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS DEL TRANSPORTADOR OsHKT1;3 Y OsHKT2;3.....	20
3.2 SUBCLONACIÓN DEL GEN <i>OsHKT2;3</i> EN pOO2.....	21
3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN.....	21
3.2.2 AMPLIFICACIÓN, DIGESTIÓN Y LIGACIÓN DE <i>OsHKT2;3</i> CON pOO2.....	22
3.2.3 ELABORACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE LA CEPA DH5 α DE <i>E. coli</i>	25
3.2.4 TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DH5 α DE <i>E. coli</i> POR CHOQUE TÉRMICO.....	26
3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm DE <i>OsHKT1;3</i> y <i>OsHKT2;3</i> DEL ARROZ.....	26
3.4 TRANSFORMACIÓN DE LA MUTANTE <i>Athkt1;1</i> DE <i>A.thaliana</i>	28
3.5 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	28
4 RESULTADOS.....	30
4.1 CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL TRANSPORTADOR OsHKT1;3.....	30
4.2 CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL TRANSPORTADOR OsHKT2;3.....	46

	4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>OsHKT1;3</i> Y <i>OsHKT2;3</i> A NIVEL DE TRANSCRITO.....	54
	4.4 OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>OsHKT1;3</i> Y <i>OsHKT2;3</i> EN LA MUTANTE DE ARABIDOPSIS <i>Athkt1;1</i>	57
5	DISCUSIÓN.....	60
6	CONCLUSIONES.....	70
7	PERSPECTIVAS.....	71
8	BIBLIOGRAFÍA.....	72

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El papel del K^+ y del Na^+ en la fisiología vegetal

La productividad agrícola se ve severamente afectada por diversos factores tanto bióticos como abióticos. Entre los factores abióticos se encuentran la sequía, niveles elevados de sal y la baja disponibilidad de nutrientes en el suelo. El potasio (K^+) es uno de los nutrientes importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ejemplo, la actividad de un gran número de enzimas es estimulada o dependiente de K^+ (Suelter, 1970). La acumulación de K^+ dentro de las células vegetales establece las condiciones necesarias para la absorción osmótica de agua, y debido a las concentraciones presentes de este ion en las plantas se le considera como un macronutriente (Marschner, 1988; Buchanan *et al.*, 2000). La baja disponibilidad del K^+ en los suelos es común y su absorción puede ser afectada por la presencia de sodio (Na^+), lo cual establece condiciones adversas para el desarrollo óptimo de las plantas (Maathuis *et al.*, 1996). La salinidad de los suelos es una de las principales causas en la disminución de la producción agrícola, afectando severamente a las tierras cultivadas en el mundo (Marschner, 1988). Esto se debe a que el Na^+ perjudica a la mayoría de las plantas de importancia agrícola a concentraciones mM en el suelo, ya que disminuye la absorción de agua, lo cual genera una pérdida en el potencial osmótico de las células que limita el crecimiento celular. Por otra parte un exceso de Na^+ puede concentrarse en el citoplasma celular inhibiendo procesos importantes como la fotosíntesis y la traducción de proteínas (Munns, 2005). Actualmente se han identificado diferentes mecanismos que podrían ayudar a disminuir el daño por el exceso de Na^+ . Estos mecanismos pueden variar entre las especies. En general, las plantas minimizan la entrada de sodio, expulsarlo de ellas, reducir la entrada de Na^+ al xilema para evitar su llegada a la parte aérea, o si ya ha sido transportado a la parte aérea recircularlo por el floema hacia las raíces. Otra manera por la cual se puede llegar a tolerar al Na^+ es mediante su secuestro en

vacuolas, por medio de antiportadores Na^+/H^+ o transportarlo hacia las hojas viejas, o incluso acumularlo en tejidos especiales como las células vejiga que están localizadas en la epidermis de las hojas (Tester y Davenport. 2003).

No obstante, las plantas requieren principalmente de K^+ , el cual se absorbe por las raíces a través de proteínas de membrana altamente especializadas entre las que se encuentran canales iónicos y/o transportadores. El estudio de la absorción de iones por la raíz (ej. K^+) comenzó mediante el uso de marcadores radioactivos como el $^{86}\text{Rb}^+$. Con base en estos resultados, se trataron a los transportadores de iones minerales como enzimas, describiendo su actividad de transporte mediante una cinética tipo Michaelis-Menten (Epstein y Elzam 1962). Estos experimentos demostraron que el flujo de los iones está constituido por dos tipos de mecanismos: uno denominado transporte de baja afinidad y otro nombrado de alta afinidad que operan a concentraciones milimolares (mM) y micromolares (μM) respectivamente, y que están constituidos por proteínas de membrana. El mecanismo de alta afinidad es inducido en condiciones de escasez de nutrientes, lo cual confiere a la planta la capacidad de absorber los iones cuando la disponibilidad de estos es baja (Epstein y Elzam 1962).

1.2 Mecanismos de transporte de K^+ y Na^+

Mediante el uso de bibliotecas de ADNc de raíces de plantas expuestas a deficiencia de K^+ para la transformación de mutantes de levaduras ($\Delta\text{trk1}\Delta\text{trk2}$) deficientes en la captura de K^+ , se pudo revelar a los primeros transportadores de captura de alta afinidad a K^+ que mostró rectificación entrante, es decir, que a potenciales de membrana menos negativos la conductancia del canal disminuye (Anderson *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992). Posteriormente se identificó a un transportador de alta afinidad a K^+ en trigo, *TaHKT1;1* (HKT, por sus siglas del inglés “*High Affinity K Transporter*”; Schachmann y Schroeder, 1994), el cual se mostró que efectuaba la captura de alta afinidad a K^+ acoplada al gradiente transmembranal de Na^+ (Rubio *et al.*, 1995), un mecanismo para la captura de K^+ inesperado en plantas por los efectos tóxicos asociados al Na^+ .

Los estudios en la búsqueda de transportadores de alta afinidad a K^+ se realizaron también en cebada, donde se pudo identificar al primer transportador HAK (HAK, por sus siglas del inglés “High Affinity K^+ transporter”) que mostró las características esperadas para los transportadores de K^+ : capacidad para transportar K^+ cuando éste se encuentra disponible a bajas concentraciones externas ($<1 \mu\text{M}$), inhibición de la captura de K^+ en presencia de NH_4^+ y una baja afinidad hacia Na^+ (Santa-María *et al.*, 1997; Santa-Maria *et al.*, 2000; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Sin embargo, cuando se obtuvo la mutante *Athak5* en *A. thaliana* (Gierth *et al.*, 2005), se observó que ésta aún podía crecer bajo condiciones limitantes de K^+ , lo que sugirió que debería de existir un sistema de captura de alta afinidad alternativo. Este sistema fue posteriormente identificado como un canal de K^+ denominado *AtAKT1* (AKT por sus siglas en inglés “Arabidopsis K^+ Transporter”), que a diferencia de los transportadores HAK no era inhibido por la presencia de NH_4^+ (Spalding *et al.*, 1999).

El modelo propuesto para la captura de K^+ en rangos μM se basa principalmente en estudios realizados en *A. thaliana*, pero puede ser aplicado a otras especies en donde se han encontrado homólogos tanto de HAK como de AKT (Santa-Maria *et al.*, 2000; Martínez-Cordero *et al.*, 2005; Bañuelos *et al.*, 2002).

1.3 Distribución anatómica de transportadores de K^+ en plantas

Esta gran variabilidad en los diferentes tipos de transportadores de K^+ , no está limitada a los mecanismos de absorción localizados en la raíz, ya que este catión tiene que ser distribuido a toda la planta para que pueda ser empleado en todos los procesos fisiológicos donde participa, y por lo tanto, debe de ser transportado a través de muchas otras membranas y tejidos. Es por ello que debe de existir un gran número de transportadores y/o canales que se encarguen de llevar a cabo estos flujos de K^+ (La tabla 1 muestra las diferentes familias de transportadores de cationes alcalinos). Las evidencias que se han obtenido hasta ahora sugieren que los transportadores HAK son los encargados de realizar

muchos de estos flujos (Grabov, 2007). Además se ha visto que *A^tHAK5* también se expresa en la parte aérea (Rubio *et al.*, 2000), y en la estela de las células de la raíz, lo que supondría su participación en el cargado del xilema (Gierth *et al.*, 2005). En trigo se ha observado que *TaHKT2;1* se expresa en los haces vasculares en la parte aérea y en la corteza, epidermis y estela de la raíz asignando una participación importante a *TaHKT2;1* en el flujo del K⁺ desde la raíz hasta la parte aérea. Sin embargo se han reportado mas transportadores/canales que tienen variadas participaciones en el flujo del K⁺ en las plantas, como son los GORK (GORK de sus siglas en ingles “Guard Cell Outward Rectifying K⁺ channel”). Estos canales están presentes en las células guarda y son activados por despolarización de la membrana plasmática, provocando la salida de K⁺ y en consecuencia el cierre de los estomas (Ache *et al.*, 2000). Otro tipo de canales son

Tabla 1. Diferentes familias transportadores de cationes alcalinos en plantas

Familia	Siglas del Ingles	Función fisiológica	Cita
HAK	High Affinity K ⁺ Transporter	Cargado del K ⁺ en el xilema	Santa-Maria <i>et al.</i> , 1997
HKT	High Affinity K ⁺ Transporter	Absorción de K ⁺ por las raíces y flujo de Na ⁺ en la planta	Schachmann y Schroeder, 1994
GORK	Guard cell Outward Rectifying K ⁺ channel	Cierre de los estomas	Ache <i>et al.</i> , 2000
SKOR	Stelar K ⁺ Outward Rectifying channel	Cargado del K ⁺ en el xilema	Gaynard <i>et al.</i> , 1998
AKT	Arabidopsis K ⁺ Transporter	Absorción de K ⁺ por las raíces	Spalding <i>et al.</i> , 1999
CNGC	Cyclic Nucleotide Gated Channel	Absorción de K ⁺ y Na ⁺ por las raíces	Balague <i>et al.</i> , 2003
LCT	Low-affinity Cation Transporter	Absorción de K ⁺ y Na ⁺ por las raíces	Amtmann <i>et al.</i> , 2001
VIC	Voltage-Insensitive monovalent Cation channel	Absorción de K ⁺ y Na ⁺ por las raíces	White, 1999

los SKOR (SKOR de sus siglas en ingles “Stelar K⁺ Outward Rectifying channel”) que se expresan en el periciclo de la raíz y en las células del parénquima de la estela. Se sugiere que su función es cargar de K⁺ al xilema, que es por donde se puede transportar a este elemento mineral desde la raíz hacia las partes aéreas

de las plantas (Gaymard *et al.*, 1998). Un tercer tipo de canales que se ha identificado en células vegetales corresponde a los TPK (*Tandem-Pore K⁺*).

AtTPK4 se expresa en la membrana plasmática y se ha propuesto que su papel está relacionado con la regulación del potencial de membrana del tubo del polen en crecimiento y en la homeostasis de K^+ (Becker *et al.*, 2004).

Los mecanismos para la adquisición de K^+ y su distribución en la planta son variados, sin embargo parece que algunos canales y/o transportadores no son altamente selectivos a este ion, permitiendo también el paso de cationes monovalentes como el Na^+ . Esto pone en riesgo la integridad física de la planta, ya que como se mencionó, el Na^+ es un elemento que en altas concentraciones en el citoplasma puede perjudicar muchos procesos biológicos (Marschner, 1988). Se ha observado que algunos de los canales CNGC (CNGC de sus siglas en inglés “Cyclic Nucleotide Gated Channel”) transportan indistintamente tanto Na^+ como K^+ , como es el caso de *AtCNGC4* (Balagué *et al.*, 2003). Propiedades similares se han reportado para los canales VIC (VIC por sus siglas en inglés “Voltage-Insensitive monovalent-Cation Channels”), canales que son inhibidos por cationes divalentes (White, 1999) y para los transportadores LCT (LCT por sus siglas en inglés “Low-affinity Cation Transporter”) en trigo (Amtmann *et al.*, 2001).

1.4 Fisiología de los HKT

Otra vía de entrada tanto de K^+ como de Na^+ son los transportadores HKT (Schachtman y Schroeder, 1994). Inicialmente el transportador *TaHKT2;1* se demostró su actividad de co-transportador Na^+/K^+ (Rubio *et al.*, 1995). Trabajos posteriores ampliaron estos resultados y se pudo demostrar que este transportador puede funcionar como un mecanismo de baja afinidad a Na^+ , cuando este catión se encuentra en concentraciones mM. Esta actividad es dominante sobre el transporte de alta afinidad a K^+ , lo que sugirió que los transportadores HKT pueden ser una vía de entrada de Na^+ en las plantas en condiciones de salinidad (Gassmann *et al.*, 1996; Rubio *et al.*, 1999).

Posteriormente se han identificado otros transportadores HKT que pueden transportar Na^+ , como *AtHKT1;1* (*Arabidopsis thaliana*; Uozumi *et al.*, 2000), *OsHKT2;1*, *OsHKT1;5* y *OsHKT1;1* (*Oryza sativa*; Horie *et al.*, 2001; Gollmack *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2005; Garcíadeblás *et al.*, 2003). Se ha propuesto que *AtHKT1;1* tiene una función importante en remover el Na^+ del xilema en las raíces. Este flujo se ha propuesto que puede suceder de manera pasiva desde los haces vasculares del xilema hacia las células del parénquima del xilema (Munns, 2005) previniendo así el transporte de Na^+ hacia las partes aéreas, sin embargo no se relaciona a *AtHKT1;1* en la absorción de Na^+ por las raíces ya que su expresión mediante el sistema del gen reportero GUS (β -Glucoronidasa) se limita a los haces vasculares del xilema (Davenport *et al.*, 2007). Por otro lado y de manera contradictoria por sus efectos tóxicos en la planta se mostró que la absorción de Na^+ a concentraciones μM puede ser benéfica para algunas plantas como arroz e interesantemente *OsHKT2;1* lleva a cabo esta absorción de alta afinidad a Na^+ . Las investigaciones a este respecto muestran que en deficiencia de K^+ la absorción de Na^+ en concentraciones μM evita la pérdida de la turgencia celular debido a la falta de K^+ y con ello se continúa con el crecimiento celular (Horie *et al.*, 2007). El grupo de Rodríguez-Navarro ha propuesto a los HKT, sobre todo a *OsHKT2;1*, como un mecanismo de transporte de alta afinidad a Na^+ y que esta captura se inhibe por la presencia de K^+ , lo cual concuerda con los resultados reportados (Garcíadeblás *et al.*, 2003; Horie *et al.*, 2007).

OsHKT1;5 se identificó mediante el mapeo de un QTL (QTL de sus siglas en inglés “Quantitative Trait Loci”) de tolerancia a la salinidad en la variedad de arroz Nona Bokra cv. Indica (Ren *et al.* 2005). Su localización mediante el gen reportero GUS permitió determinar su expresión en los haces vasculares que rodean al xilema, lo que condujo a estos autores a proponer una función para *OsHKT1;5* similar a la que se propone para *AtHKT1;1* (Davenport *et al.*, 2007). Recientemente se propuso que el homólogo de trigo, *TmHKT1;5* (*Triticum monococcum*) realiza la misma función de remover el Na^+ del xilema en la raíz (Byrt *et al.*, 2007). Un papel similar se propuso para *TmHKT1;4* ya que se expresa en la raíz aunque también se expresa en la cobertura de la hoja. En la cobertura

de la hoja se midieron altas concentraciones de Na^+ , siendo estas muy elevadas con respecto a las de la hoja. La conjetura inmediata fue que este transportador retiene al Na^+ en la cobertura de la hoja, previniendo así, que el Na^+ llegue a ésta evitando el daño a los procesos enzimáticos en el citoplasma (Huang *et al.*, 2006). Con base en las evidencias obtenidas hasta ahora para los transportadores HKT, a estos mecanismos se les ha considerado que son importantes en la tolerancia a la salinidad en plantas.

1.5 Organización estructural de los HKT y selectividad

De todos los mecanismos que llevan a cabo el transporte de K^+ antes mencionados, los transportadores HKT poseen propiedades de gran interés debido a sus características particulares de transporte. Pueden funcionar como transportadores de alta afinidad a K^+ o de baja afinidad a Na^+ . La estructura funcional de las proteínas HKT en plantas es muy similar a la de los canales de K^+ tipo KcsA descrito en bacterias (Figura 1A y 1C), ya que poseen la estructura de dos dominios transmembranales (2TM) flanqueando un segmento P (1P), repetida cuatro veces (Figura 1C; Kato *et al.*, 2001; Durell y Guy, 1999). En esta estructura 2TM/1P del canal de K^+ KcsA, se identificó que el asa formadora del poro (P) es determinante en la selectividad al K^+ (Doyle *et al.*, 1998; Berneche & Roux, 2001; Roux & MacKinnon, 1999). Esta región del poro en el canal KcsA así como en otros canales selectivos a K^+ se encuentra altamente conservada en secuencia, donde se localiza un motivo Glicina-Tirosina-Glicina (G-Y-G Figura 1A) que es característico de los canales de K^+ (Heginbotham *et al.*, 1994). El estudio de la estructura del canal bacteriano KcsA reveló que el punto más estrecho del canal, donde se lleva a cabo el contacto con el K^+ , está formado por el esqueleto de los grupos carbonilos de la primera glicina del motivo GYG (Doyle *et al.*, 1998).

La estructura cuaternaria de las proteínas HKT en plantas se ha propuesto es similar a la estructura tetrámerica de los canales de K^+ KcsA, conservando parcialmente la arquitectura del poro (Figura 1B; Durell & Guy, 1999; Durell *et al.*, 1999). A diferencia del canal KcsA que está constituido por la tetramerización de

un monómero con la arquitectura 2TM/1P, los transportadores tipo HKT poseen cuatro asas formadoras de poro o segmentos P (P_A , P_B , P_C y P_D) y ocho dominios transmembranales en una sola cadena polipeptídica (Figura 1C; M1P_AM2-

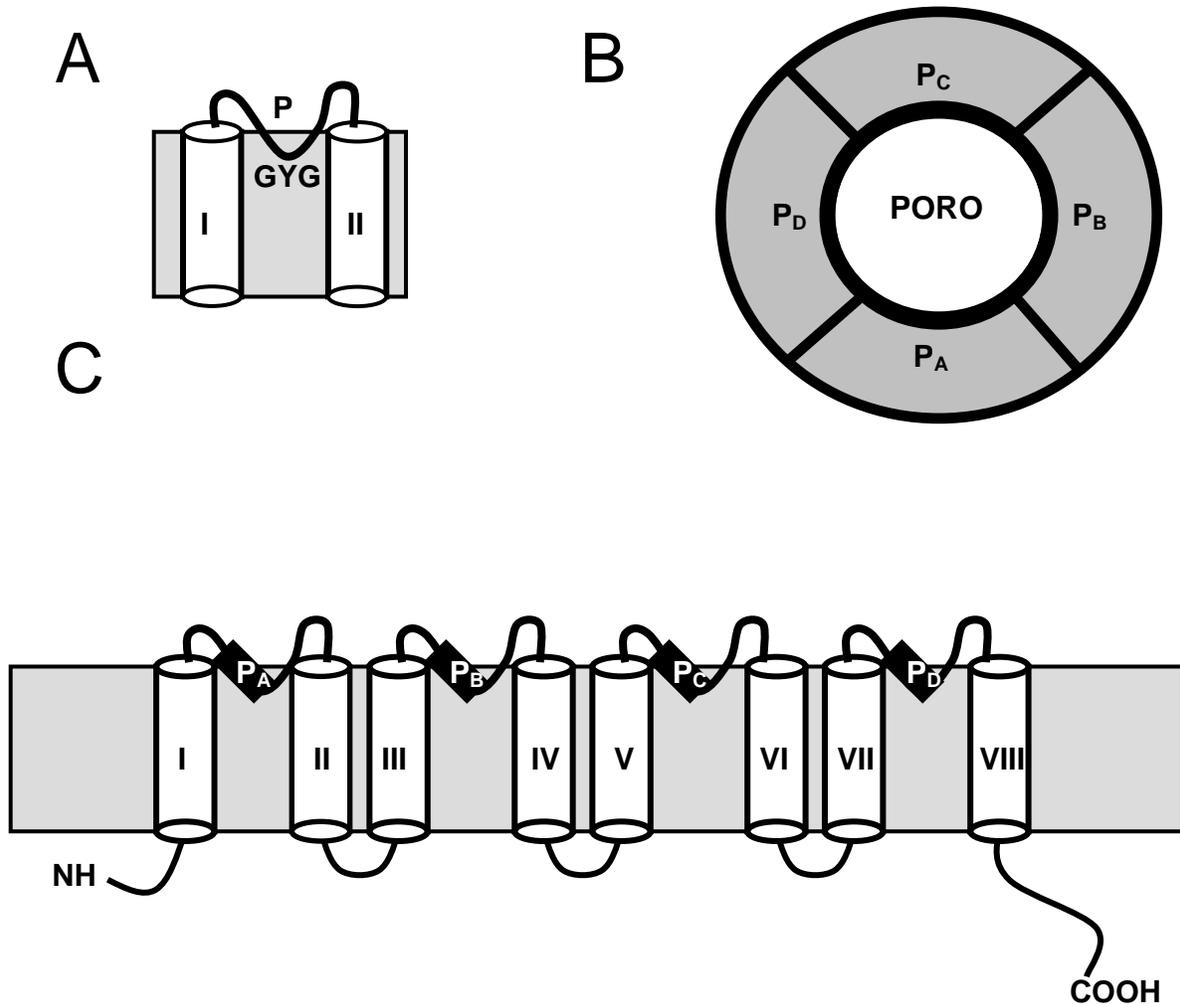


Figura 1. Topología de los transportadores HKT. En **A** se muestra al monómero del canal bacteriano KcsA con sus dos dominios transmembranales (I y II) y el segmento P que los une, así como el motivo de aminoácidos GYG dentro del segmento P determinante en la selectividad a K^+ . **B** muestra la conformación de los cuatro monómeros de KcsA formando el poro de selectividad. El subíndice de cada segmento P indica al monómero A, B, C y D. **C** muestra la topología de los transportadores HKT, la cual se integra de 8 dominios transmembranales y 4 segmentos P en una sola cadena polipeptídica. Tanto el amino como el carboxilo terminal se encuentran en el lado citoplasmático.

P_A

OsHKT1;5	R	P	M	D	L	D	L	I	F	T	S	V	S	A	T	T	V	S	S	M	V	A	V	E	M	E	S	F
OsHKT1;4	A	P	R	R	I	D	R	F	F	T	A	V	S	A	A	T	V	S	S	M	S	T	V	E	M	E	V	F
EcHKT1;2	R	P	R	D	L	D	L	F	F	T	S	V	S	L	A	T	V	S	S	M	S	T	V	E	M	E	V	L
EcHKT1;1	R	P	R	D	L	D	L	F	F	T	S	V	S	A	T	T	V	S	S	M	S	T	V	E	M	E	V	F
AtHKT1;1	R	P	H	D	F	D	L	F	F	T	S	V	S	A	I	T	V	S	S	M	S	T	V	D	M	E	V	F
McHKT1;1	R	H	D	D	L	D	L	F	F	T	S	V	S	A	T	T	I	S	S	M	S	T	I	E	M	E	D	F
OsHKT1;2	T	P	R	D	L	D	L	M	F	T	S	V	S	T	A	A	V	S	S	M	S	T	V	E	M	E	D	F
OsHKT1;1	G	P	K	D	L	D	L	L	F	T	S	V	S	T	L	T	V	S	S	M	A	T	V	E	M	E	D	L
OsHKT1;3	T	L	K	D	L	D	V	L	F	T	S	V	S	A	S	T	V	S	S	M	A	T	V	E	M	E	D	F
OsHKT2;3	N	P	R	Y	V	D	M	F	F	L	S	T	S	A	V	T	V	I	G	L	A	T	I	Q	M	E	D	L
OsHKT2;4	N	P	R	Y	I	D	M	F	F	L	S	T	S	A	V	T	V	T	G	L	A	T	T	Q	M	E	D	L
OsHKT2;1	R	P	G	Y	I	D	M	L	F	L	S	T	S	A	L	T	L	S	S	L	I	T	I	E	M	E	V	L
Po-OsHKT2;2	K	P	G	Y	I	D	M	L	F	L	S	T	S	A	M	T	V	S	G	L	S	T	I	E	M	E	V	L
TaHKT2;1	S	P	P	Y	I	D	M	L	F	L	S	T	S	A	L	T	V	S	G	L	S	T	I	T	M	E	D	L

Figura 2. Alineamiento de varias secuencias en el segmento P_A pertenecientes a diferentes transportadores HKT. En fondo negro y letras blancas se resalta al aminoácido propuesto en conferir la selectividad en los transportadores HKT. En todos los transportadores pertenecientes a la subfamilia 1 esta presente una S, asociada con la selectividad a Na⁺, mientras que en la subfamilia 2, excepto OsHKT2;1, esta presente una G, asociada con la selectividad a K⁺. En fondo blanco se resalta una M y dos L presentes solo en los transportadores pertenecientes a la subfamilia 2. La línea negra muestra los aminoácidos que forman el segmento P_A.

M1P_BM2-M1P_CM2-M1P_DM2; Mäser *et al.*, 2002). En algunos HKT la G del P_A no esta conservada ya que está substituida por una S, lo cual se ha asociado con la pérdida de selectividad a K⁺ (Figura 2; Mäser *et al.*, 2002). Por ejemplo, los transportadores TaHKT2;1 y OsHKT2;2 que poseen una G en cada uno de los cuatro segmentos P, transportan K⁺ acoplado al gradiente de Na⁺ (Rubio *et al.*, 1995; Horie *et al.*, 2001). Por otro, lado los transportadores AtHKT1;1, OsHKT2;1,

OsHKT1;5 y OsHKT1;1 que poseen una S en el primer segmento (P_A) se han identificado como transportadores de Na^+ (Uozumi *et al.*, 2000; Horie *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2005; Garcíadeblás *et al.*, 2003). Sin embargo, estos resultados contrastan con los reportados para los transportadores HKT de Eucalipto, *EcHKT1;1* y *EcHKT1;2*, que poseen la secuencia S-G-G-G y que funcionan como co-transportadores Na^+/K^+ (Fairbain *et al.*, 2000). Además, existen reportes con mutantes del transportador *TaHKT2;1* en aminoácidos localizados en regiones diferentes al poro que cambian la selectividad a K^+ (Rubio *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 1999), o a Na^+ (Diatloff *et al.*, 1998), y que sugieren que la selectividad de los transportadores HKT no reside exclusivamente en cambios de la primera G del motivo G-Y-G en los segmentos P.

1.6 Filogenia de las proteínas HKT

El análisis filogenético de las secuencias de los transportadores HKT ha permitido su agrupación, donde se ha podido observar que la familia es muy divergente entre si, incluso esta divergencia es evidente en los siete transportadores presentes en el arroz (Figura 3; Garcíadeblás *et al.*, 2003; Platten *et al.*, 2006). Básicamente, el árbol filogenético de la Figura 3 muestra que los transportadores que poseen el aminoácido G conservado en el segmento P_A están agrupados en la subfamilia 2 y que el mínimo de identidad que comparten es del 60 %. Es importante mencionar que *OsHKT2;1* muestra una gran identidad con el resto de los miembros de esta rama, pero no conserva la G del en el segmento P_A . El análisis del alineamiento de los transportadores que se encuentran en esta subfamilia 2 muestra que estos poseen una metionina y dos lisinas en el segmento P_A que en los otros ortólogos de HKT no se conservan (Figura 2). El resto de los transportadores HKT comparten una identidad entre el 40 y 50 %. Nuevamente, estos datos sugieren que las propiedades de transporte en los HKT homólogos podrían no yacer exclusivamente en la secuencia localizada en el segmento P_A .

1.7 Justificación

Debido a que no todos los HKT presentan las mismas propiedades de transporte, la interpretación de su función en la planta como familia de transportadores de alta afinidad a K^+ es difícil de asignar, aunque por las evidencias reportadas hasta ahora, es posible que estos transportadores

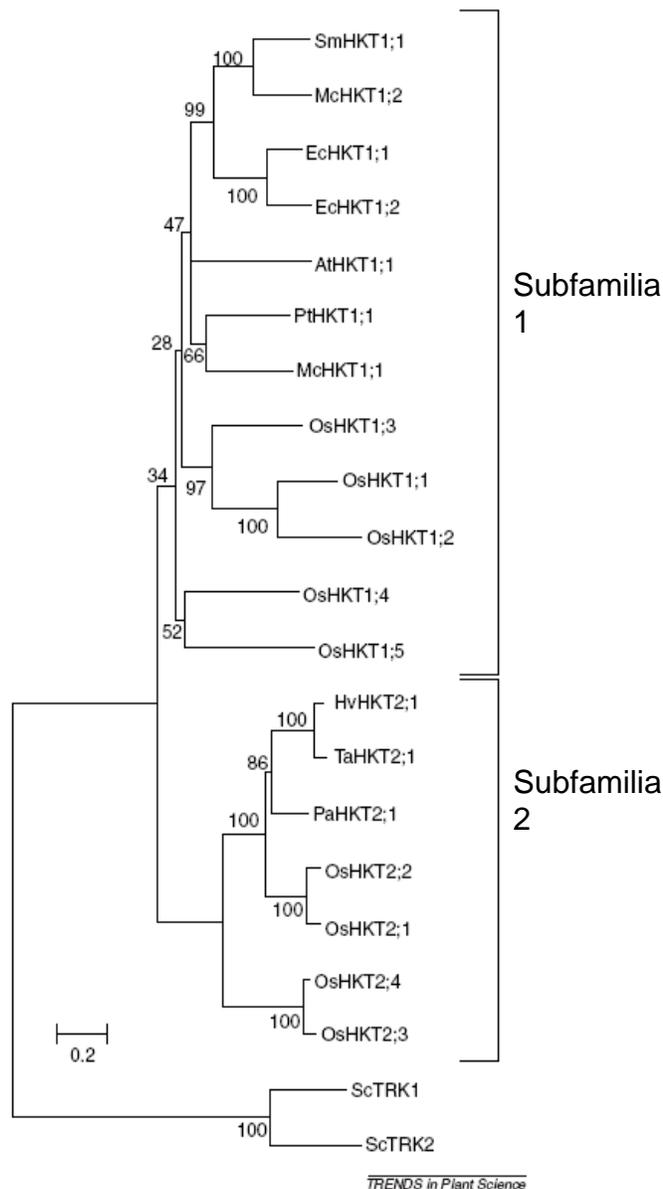


Figura 3. Árbol filogenético de los transportadores HKT. Se muestra que la familia se subdivide en dos grupos. *Saccaromyces cerevisiae* (Sc) TRK1 y TRK2 están incluidos como dos grupos aparte. Abreviaciones: *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Ec*, *Eucaliptus calmodulensis*; *Hv*, *Hordeum vulgare*; *Mc*, *Mesembryanthemum cristallium*; *Os*, *Oryza sativa*; *Pa*, *Phragmites australis*; *Pt*, *Populus trichocarpa*; *Sm*, *Suaeda maritima*; *Ta*, *Triticum aestivum*.

participen en procesos de tolerancia a la salinidad. Sin embargo, es probable que estas diferencias en el transporte reportadas para los distintos HKT se deba a los sistemas de expresión heterólogos usados, ya que hay diferencias en los resultados obtenidos cuando se utilizan dos sistemas de expresión heteróloga distintos para un mismo transportador. Por ejemplo, Garciadeblás *et al.* (2003) identificaron en arroz siete miembros de la familia HKT además de dos pseudogenes. Los estudios realizados por estos investigadores mediante complementación de levaduras mutantes que no poseen los mecanismos de captura de K^+ de alta afinidad ($\Delta trk1\Delta trk2$), mostraron que ninguno de los transportadores HKT del arroz puede llevar a cabo la captura de K^+ . Sin embargo, al evaluar si alguno de estos transportadores podría mediar la captura de Na^+ , sólo dos de estos transportadores, OshKT2;1 y OshKT1;1, pudieron realizar el transporte de alta y baja afinidad a Na^+ , respectivamente. Bajo ninguna condición experimental fue posible detectar el transporte de K^+ efectuado por alguno de los transportadores HKT del arroz (Garciadeblás *et al.*, 2003). Estos resultados contrastan con los reportes de Horie *et al.* (2001) y Gollmack *et al.* (2002) quienes demostraron que OshKT2;1 es capaz de mediar el transporte de alta afinidad a K^+ en ovocitos de *X. laevis*.

En nuestro laboratorio hemos observado que OshKT2;1 funciona como un transportador de alta afinidad para K^+ , pero como un mecanismo de transporte de baja afinidad a Na^+ en el sistema de los ovocitos de *X. laevis*. Sin embargo, en presencia de ambos cationes, el K^+ es capaz de bloquear el transporte de Na^+ , aún en condiciones donde este último se encuentra a concentraciones 10 veces mayores que el K^+ . En comparación, y de acuerdo a lo reportado para *TaHKT2;1* (Rubio *et al.*, 1995), hemos podido confirmar que este transportador funciona como co-transportador K^+-Na^+ , aunque aún no es claro si los dos cationes son transportados. En *A. thaliana*, las propiedades de transporte de *AtHKT1;1* expresado en levaduras se correlacionaron con las obtenidas en ovocitos de *X. laevis*, donde se observó que este transportador es altamente selectivo a Na^+ (Ouzumi *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando se complementaron células de *E. coli* deficientes en la captura de K^+ ($\Delta trk \Delta kup \Delta kdp$) con *AtHKT1*, se observó que este

transportador podía llevar a cabo la captura de K^+ (Uozumi *et al.*, 2000). Las evidencias descritas anteriormente indican aparentemente que existe cierta influencia del sistema heterólogo empleado sobre las propiedades de los transportadores HKT de plantas y, por lo tanto, agregan incertidumbre sobre el papel de estas proteínas en la fisiología de las plantas.

Pese al gran interés sobre los transportadores HKT, existen varios de ellos a los que aún no se les ha determinado sus propiedades de transporte, siendo el paso inicial para poder tener una idea de su posible participación en la fisiología de la planta. En arroz aún no se han caracterizado electrofisiológicamente en el sistema heterólogo de *X. laevis* a OsHKT2;3, OsHKT1;3 y OsHKT1;1. Garcíadeblás y colaboradores determinaron que OsHKT1;1 puede llevar a cabo el transporte de Na^+ de baja afinidad, sin embargo, no reportaron actividad alguna para OsHKT1;3 y OsHKT2;3 al transformar a mutantes ($\Delta trk1\Delta trk2$) de levadura con estos transportadores. Interesantemente, hasta ahora todos los transportadores HKT expresados en los ovocitos de la rana *X. laevis* han mostrado actividad, lo que indica la posibilidad de poder determinar en este sistema de expresión heteróloga las propiedades de los transportadores OsHKT1;3 y OsHKT2;3. Estos transportadores pertenecen a diferentes subfamilias, lo que supondría una diferencia en las propiedades de transporte.

Por otro lado la expresión del transcrito de OsHKT1;3 y OsHKT2;3 en la parte aérea y en las raíces no mostró algún cambio en la cantidad del transcrito en respuesta a sal (Garcíadeblás *et al.*, 2003). Esta cuantificación en la abundancia de los transcritos se llevó a cabo en la variedad Nipponbare de arroz la cual es sensible a la salinidad. No obstante, los antecedentes sobre los HKT los asocian con mecanismos de tolerancia a la salinidad. Por ello es importante establecer si los transportadores OsHKT1;3 y OsHKT2;3 tienen un papel significativo como mecanismos de adaptación al estrés salino de tal manera que empleando una variedad tolerante a la salinidad como lo es Pokkali se determine si la expresión de estos transportadores esta presente en los mismo tejidos y si su abundancia cambia por estrés por sal.

Hipótesis

La regulación de las proteínas OsHKT1;3 y OsHKT2;3, como posibles transportadores de Na^+ y $\text{Na}^+\text{-K}^+$, respectivamente podría ser a nivel transcripcional durante la deficiencia de K^+ y estrés salino.

2 Objetivo General

Determinar la función de los transportadores OsHKT1;3 y OsHKT2;3.

Objetivos Particulares

- Caracterizar las propiedades de transporte de OsHKT1;3 y OsHKT2;3 mediante su expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* en combinación con la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.
- Determinar el nivel de expresión del transcrito de OsHKT1;3 y OsHKT2;3 en raíces y hojas de arroz crecidas bajo condiciones de estrés salino, deficiencia de K^+ y control.
- Obtener plantas homocigas de mutantes de *Arabidopsis Athkt1;1* transformadas con OsHKT1;3 y OsHKT2;3.

3 Materiales y Métodos

3.1 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN LOS OVOCITOS DE *Xenopus laevis*.

La caracterización electrofisiológica de los transportadores OsHKT1;3 y OsHKT2;3, se realizó a través de su expresión heteróloga en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

3.1.1 OBTENCIÓN Y DEFOLICULACIÓN DE LOS OVOCITOS

Para la obtención de los ovocitos, inicialmente se anestesió por 30 min a la rana con tricaina (ETHYL-m-AMINOBENZOATE METAHENE SULFONIC ACID; Sigma-Aldrich, Toluca, México) al 0.15% disuelta en agua por 30 min. Una vez que se comprobó que la rana se encontraba anestesiada, se procedió a obtener los ovocitos. Para esto, se hizo una incisión en el abdomen de 0.5 cm para poder tener acceso a los lóbulos de los ovarios, de donde se obtuvieron los ovocitos. Una vez que se había colectado un número suficiente de ovocitos, los ovarios se colocaron dentro de la cavidad abdominal y la rana se suturó. Los ovocitos así obtenidos se colocaron en una caja Petri con solución OR-2 libre de calcio (NaCl 82.5 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, a 0.240-0.260 osmol/kg y un pH de 7.5 ajustado con NaOH) y se separaron manualmente. Para facilitar la remoción de las células foliculares, que envuelven a los ovocitos, estos se incubaron en la misma solución conteniendo colagenasa (0.5 mg/ml; Sigma-Aldrich, Toluca, México) por 30 min a temperatura ambiente y después se lavaron varias veces con la solución OR-2 libre de calcio. Posteriormente los ovocitos se dejaron reposar durante 4 h. Pasado este tiempo, las células foliculares fueron removidas manualmente bajo un microscopio estereoscópico y con ayuda de unas pinzas de punta muy fina. Los ovocitos seleccionados, fueron de tamaño grande (estados V-VI) mostrando los polos animal y vegetal bien definidos, es decir, bien coloreados (negro y amarillo, respectivamente) y con un borde bien definido entre ambos polos. Finalmente, los ovocitos fueron colocados en solución ND-96 con calcio (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM,

Gentamicina 50 µg/ml, a 0.240-0.260 osmol/kg y pH de 7.6 ajustado con NaOH) y se incubaron a 15°C durante toda la noche.

3.1.2 TRANSCRIPCIÓN *In vitro* DEL ADNc de OsHKT1;3 y OsHKT2;3

Para poder expresar los transportadores OsHKT1;3 y OsHKT2;3 en la membrana plasmática de los ovocitos, éstos tuvieron que ser inyectados con ARN, el cual se obtuvo de la transcripción *in vitro* que se describe a continuación.

Las construcciones pOO2-OsHKT1;3 y pOO2-OsHKT2;3 se digirieron con la enzima de restricción Bbr PI siguiendo las recomendaciones del proveedor (Roche, México), que tiene su sitio de restricción inmediatamente por debajo del inserto, para así producir un templado lineal y de esta manera la ARN polimerasa puede generar el ARNm. El plásmido pOO2 posee al promotor SP6. La digestión se detuvo agregando 1/20 del volumen de EDTA 0.5 M, 1/10 del volumen de Acetato de Sodio (NaAc) 3 M y 2 volúmenes de Etanol frío. Se mezcló bien y se dejó enfriar a -20°C por al menos 15 minutos. El ADN se sedimentó por centrifugación en una microcentrifuga durante 15 minutos a máxima velocidad (13,000 rpm). A continuación se removió el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua libre de ARNasas. Esta agua se obtuvo mezclando agua MQ y DEPC (dietil pirocarbonato) 0.05 % en agitación continua e incubándose toda la noche a 37°C; por último esterilizándose en una autoclave durante 25 min.

De las construcciones pOO2-OsHKT1;3 y pOO2-OsHKT2;3 linealizadas, se tomaron muestras con una concentración de 1µg/µl y la transcripción *in vitro* se realizó de acuerdo a las indicaciones del paquete mMessage mMachine (Ambion. 2130 Woodward St. Austin TX USA). Posteriormente, esta reacción se incubó a 37°C durante 12 h.

Para recobrar el ARN se agregó a la reacción 30 µl de LiCl 7.5 M, se mezcló muy bien y se incubó durante 30 min a -20°C. A continuación, se centrifugó durante 15 min a máxima velocidad para coleccionar el ARN en el fondo de un tubo de 1.5 ml. Con cuidado se removió el sobrenadante y la pastilla de ARN se lavó agregando 1 ml de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar para remover los

nucleótidos que no se incorporaron en la reacción. Con cuidado se eliminó el etanol al 70% y el ARN se resuspendió en agua libre de ARNasas.

La cantidad de ARN obtenida se determinó empleando un espectrofotómetro de luz UV (Hewlett Packard, México, D.F.). Debido a que una unidad de absorbancia a A_{260} corresponde a 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN para una sola hebra, la producción de ARN se calculó con la siguiente fórmula:

$$(A_{260}) (\text{Factor de dilución})(40) = \mu\text{g/ml ARN}$$

Otra manera de poder apreciar y cuantificar el ARN fue corriendo geles de agarosa al 1 %, la cual se disolvió en buffer de corrida para geles con MOPS 10X (MOPS 0.1 M pH 7.0, Acetato de Sodio 40 mM y EDTA 5 mM a pH 8.0) y Formaldehído 2.2 M. Por cada μl de muestra de ARN se agregaron 9 μl de Buffer de carga (Formamida 2 μl , MOPS 10x 1 μl , Formaldehído 2 μl , Buffer de carga II provisto por el paquete mMessage mMachine de Ambion 1 μl y 10 mg/ml de Bromuro de Etidio). A continuación, estas muestras se cargaron en los pozos del gel y se corrieron en una cámara de electroforesis conteniendo Buffer de corrida para geles con Formaldehído (MOPS 1X) a 50 Volts durante 60 min en una campana de extracción (el formaldehído genera gases tóxicos). Con la ayuda de un transiluminador de UV se pudo observar el ARN.

Habiendo determinado la concentración del ARN, éste se guardó a -70°C hasta antes de ser usado.

3.1.3 MICROINYECCIÓN DEL ARN DE *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* EN LOS OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

Para la microinyección del ARN de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* fue necesario utilizar una micropipeta (Drummond, U.S.A. Cat. No. 3-000-204) de 10 μl , la cual fue moldeada con un hacedor de micropipetas KOPF (David KOPF Instruments, California U.S.A. Modelo 730). Para llenar la pipeta con el ARN, la punta de la pipeta se rompió de tal manera que quedara abierta a un diámetro de 10-20 μm . Posteriormente esta pipeta se llenó con aceite mineral evitando dejar burbujas

dentro de la misma. La pipeta se colocó dentro del émbolo del microinyector y el ARN (1-2 μ l), colocado en parafilm (Pechiney, Chicago, USA), se succionó; para poder manejar con precisión al microinyector éste se colocó en un micromanipulador mecánico (MMN8 Narishige, Japón). Los ovocitos inmersos en solución ND96 se microinyectaron bajo observación en un microscopio estereoscópico (SMZ645 Nikon, Japón). Los ovocitos se colocaron en fila dentro de una caja Petri y para evitar que éstos se movieran, el piso de la caja Petri se rayo haciendo la superficie áspera. La cantidad de ARN inyectado en los ovocitos fue de 13.8 ng en volúmenes no mayores a 50 nl. Los ovocitos así inyectados se colocaron en solución ND96 y se incubaron a 15°C por 48 h para posteriormente ser empleados en los registros electrofisiológicos.

3.1.4 REGISTROS ELECTROFISIOLOGICOS DEL TRANSPORTADOR OsHKT1;3 y OsHKT2;3

El registro de las corrientes causadas por la expresión de los transportadores OsHKT1;3 y OsHKT2;3 se realizó de 2 a 5 días después de la microinyección. La técnica que se utilizó fue la de fijación de voltaje con dos electrodos empleando el amplificador GeneClamp 500 (Axon Instruments Inc. Foster City. USA). Los microelectrodos de registro se obtuvieron elaborando micropipetas de 100 μ l (Sigma-Aldrich, Toluca, México) con el hacedor de pipetas, KOPF. Estos microelectrodos se llenaron con una solución de KCl 1M y se insertaron en los portaelectrodos que contenían un alambre de Ag/AgKCl; estos portaelectrodos a su vez, se montaron por separado a los cabezales HS-24 (Axon Instruments Inc.). Al sumergir los microelectrodos dentro de la solución 00 (MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.8 mM y MES-Tris 10 mM pH 7.5) se midió el potencial de la punta y se ajustaron a 0 mV, al mismo tiempo se midió la resistencia de los mismos la cual varió entre 0.5 a 5 M Ω , pero generalmente, se emplearon dos electrodos con la misma resistencia eléctrica. Para el registro de las corrientes eléctricas, el ovocito se colocó dentro de una cámara de acrílico insertando inicialmente el electrodo de Voltaje, y a continuación el electrodo de Corriente. La solución 00 se dejó fluir y se esperó hasta que el potencial de membrana se estabilizara. Una vez estable, el potencial de membrana se fijó mediante el programa Clampex del paquete

pClamp6 instalado en un computador PC 486. El registro y el análisis de los resultados, se realizaron empleando los programas Clampex y Clampfit, respectivamente, incluidos en el paquete pClamp6.

Las soluciones de K^+ y de Na^+ se prepararon tomando a la solución 00 como base y agregándole Gluconato de K^+ y/o Gluconato de Na^+ en las concentraciones deseadas. En los experimentos que se realizaron para determinar la selectividad de los transportadores a los diferentes cationes alcalinos se emplearon sales de cloro en la misma solución 00. En soluciones con concentraciones de 50, 75 y 100 mM se mantuvo la osmolaridad entre 230-250 miliOsmoles).

3.2 SUBCLONACION DEL GEN *OsHKT2;3* EN POO2

Registros iniciales con la construcción pOO2/*OsHKT2;3* mostraron que en presencia de Na^+ o K^+ (gluconatos) no se activaba corriente alguna en los ovocitos. Debido a que anteriormente no se había presentado este problema, se pensó que posiblemente durante los procesos de clonación y construcción del vector de expresión, se pudieron haber insertado pares de bases extras que pudiesen afectar la estabilidad del ARN o el proceso de traducción. Para esto, se volvió a secuenciar la construcción pOO2/*OsHKT2;3* original y se pudo observar que en la región 5' existían aproximadamente 100 pares de bases extras conteniendo varios ATG, además del correspondiente para *OsHKT2;3*. Para determinar si estos pares de bases eran responsables de la falta de actividad en los ovocitos, se procedió a la subclonación de *OsHKT2;3* en el vector POO2, removiendo aquellas bases que no correspondían al marco abierta de lectura (ORF) como se describe a continuación.

3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Con el objetivo de obtener la nueva construcción del gen *OsHKT2;3* en pOO2 se requirió de la manipulación del ADN y para ello de su extracción de bacterias. La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo mediante lisis alcalina, el cual se describe a continuación.

Inicialmente la cepa DH5 α de *E. coli* con la construcción pOO2/OsHKT2;3 se creció en LB (Triptona 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l y pH ajustado a 7.0 con NaOH) y 50 mg/l de ampicilina durante toda la noche (aproximadamente 12 horas) a 37°C con movimiento, para obtener suficientes células y así aislar una cantidad adecuada de ADN. Posteriormente el contenido de cada uno de los tubos Falcon se vertió en 2 microtubos de 1.5 ml. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 min en una microcentrifuga (Sorvall, MICROFUGE *pico*) para sedimentar las células. Se desechó el sobrenadante por medio de vacío y la pastilla se resuspendió en 100 μ l de solución I (Glucosa 1%, Tris 25 mM, EDTA 10 mM pH 8) para establecer a las células. A continuación se agregaron 200 μ l de solución II (NaOH 0.2 M y SDS 1%) mezclándose por inversión suave tres o cinco veces (con esta solución se rompen las membranas de las células). Por último, se agregaron 150 μ l de Acetato de Amonio 7.5 M a -20 °C y se dejó reposar en hielo durante 10 min para precipitar al ADN. A continuación se centrifugaron los tubos a 12000 rpm durante 15 min en una microcentrifuga (Sorvall, MICROFUGE *pico*); se colectó el sobrenadante conteniendo el ADN, el cual se transfirió a un microtubo de 1.5 ml. A la fase acuosa se le agregaron dos volúmenes de etanol frío para precipitar el ADN y se dejó reposar en hielo durante 10 min, posteriormente se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm en una microcentrifuga. Se vertió el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70% (la evaporación del etanol es muy importante para lograr reacciones enzimáticas óptimas, por lo que fue necesario esperarse de 10 a 15 minutos después del lavado). Por último, se resuspendió la pastilla en 30 μ l de agua Milli Q (agua bidestilada) y el ADN se guardó a -20 °C.

Este método también se empleó para extraer el vector de expresión para los ovocitos pOO2, el cual se encontraba dentro de la cepa DH5 α .

3.2.2 AMPLIFICACIÓN, DIGESTIÓN Y LIGACIÓN DE OsHKT2;3 CON pOO2

Mediante un análisis de los sitios de restricción de la construcción pOO2/OsHKT2;3 se concluyó que las enzimas de restricción Nco I y KpnI eran las adecuadas para digerir el ADN extraído, ya que el sitio de clonación múltiple del

vector pOO2 posee los sitios de acción para estas enzimas. Al mismo tiempo se comprobó que dentro del ADNc de OsHKT2;3 no existía algún sitio de restricción para éstas enzimas evitando así el corte del inserto OsHKT2;3.

Tabla 2. Oligos usados para las reacciones de PCR.

Nombre	Secuencia	Posición	Notas
OsHKT2;3 UP	(5'→3') atatCCATGGtcatgcctattcggctgcatatctttg	1 a 25	Oligo sentido. Posee el sitio de restricción para NcoI (letras mayúsculas)
OsHKT2;3 LOW	(5'→3') agctGGTACCtcacctagttcgtgcgcttggtg	1507 a 1530	Oligo antisentido. Posee el sitio de restricción para KpnI (letras mayúsculas)
For6H	(5'→3') gcagctagcaagttctcttc	56-76	Oligo sentido, usado para poder cuantificar la expresión de OsHKT1;3 mediante RT-PCR.
Rev6H	(5'→3') ggtaccaggttaaggtagagg	637-658	Oligo antisentido, usado para poder cuantificar la expresión de OsHKT1;3 mediante RT-PCR.
ForHKT2;3	(5'→3') agcatgatcctgaaaaccgt	369-389	Oligo sentido, usado para poder cuantificar la expresión de OsHKT2;3 mediante RT-PCR.
RevHKT2;3	(5'→3') ctacaaaagcaacctccaca	904-924	Oligo antisentido, usado para poder cuantificar la expresión de OsHKT2;3 mediante RT-PCR.
ForRAC	(5'→3') atgaccagatcatgtttgagacc	360-384	Oligo sentido, usado para poder cuantificar la expresión de OsRAC1 mediante RT-PCR.
RevRAC	(5'→3') atacccgcagcttcattcctat	804-827	Oligo antisentido, usado para poder cuantificar la expresión de OsRAC1 mediante RT-PCR.

Para colocar los sitios de restricción a la secuencia del gen OsHKT2;3 se emplearon oligos posicionados en el inicio (ATG) y al final (TGA) del marco de lectura del gen OsHKT2;3 con los sitios de restricción para las enzimas NcoI y KpnI (Tabla 2). Se hicieron reacciones de PCR usando la Taq polimerasa AccuPrime y se siguieron las recomendaciones del proveedor (Invitrogen, la Jolla California). Para ligar al gen OsHKT2;3 con el plásmido pOO2, los productos de PCR que donde esta el gen OsHKT2;3 se corrieron en geles de agarosa al 0.8% disuelta en TAE (0.02 M Tris-acetato, 0.0005 M EDTA) en una cámara de electroforesis con solución de corrida (TAE) a 100 V durante 30 min. Empleando un marcador de peso molecular (Gene Ruler™ 1 Kb. Fermentas Ontario, Canada) y una tinción con bromuro de etidio se pudo observar el fragmento de ADN en un transiluminador de UV. El aislamiento del fragmento del gel se realizó con el paquete Rapid Gel Extraction System (Marligen Biosciences. Inc Urbana Pike Ljasville, MD USA). Para ligar el inserto OsHKT2;3 dentro del vector pOO2, inicialmente al producto de PCR se le hizo una doble digestión con las enzimas NcoI y KpnI siguiendo las indicaciones del proveedor (Roche) para poder obtener la eficiencia máxima de digestión. El vector pOO2 también fue sometido a una doble digestión con las mismas enzimas, NcoI y KpnI, y su aislamiento del gel de agarosa se hizo como se menciona anteriormente. La ligación de OsHKT2;3 dentro del vector pOO2 se realizó con la T4 ligasa; la eficiencia de esta reacción dependió de la concentración de la enzima (U/mL), así como de la concentración del vector y del inserto que se mezclaron en la ligación. Por lo general se empleo una proporción de 1:10 de vector:inserto que en cantidades de DNA fueron 150 ng del vector y 500 ng del inserto. Estas cantidades en ng de vector:inserto se obtuvieron de la siguiente formula:

$$\mu g \text{ ADN} = fmolas \text{ ADN} \left(\frac{1 \mu g}{3000 fmolas} \right) \frac{\text{tamaño ADN pb}}{1000 pb}$$

Los pesos moleculares de OsHKT2;3 es de 1500 pb y del vector pOO2 es de 3000 pb. La cantidad de inserto y de vector agregados a la reacción se calcularon con geles teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador de UV. Los p

3.2.3 ELABORACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE LA CEPA DH5 α DE *E. coli*

Mediante la clonación (técnica para insertar ADN exógeno y realizar múltiples copias) se pudo verificar si la ligación pOO2/OsHKT2;3 se llevó a cabo. Esta técnica requiere de células capaces de aceptar ADN no propio o también denominadas células competentes.

Para ello se inoculó la cepa DH5 α de *E. Coli*, (la cual no posee resistencia a antibiótico alguno) en 3 ml de medio LB fresco, dejando reposar durante toda la noche a 37°C en agitación. A este cultivo se le denomina preinóculo. Posteriormente a 50 ml de medio LB fresco se le agregaron 500 μ l del preinóculo, incubándose a 37°C por 2 h, hasta que se obtuvo una OD₆₀₀= 0.25 (1.2X10⁸ células/ml). Alcanzado esta densidad, las células se colocaron en hielo por 20 min, y para todos los pasos subsecuentes se conservaron a 4°C. Posteriormente, las células se transfirieron a dos tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min a 4°C en una centrifuga Beckman GS-15R con un rotor S4180 (Beckman-Coulter, México). Cuidadosamente, el sobrenadante se vertió y la pastilla se resuspendió en 15 ml de TBI (Buffer de Transformación I; acetato de potasio 30 mM, MnCl₂ 50 mM, RbCl 100mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15 % ajustado a pH 5.0 con ácido acético). Las células se centrifugaron nuevamente a 4000 rpm durante 5 min a 3-4°C en el mismo rotor. Se volvió a desechar el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 15 ml de TBI y se incubó durante 10 minutos a 4°C. Se repitió la centrifugación para coleccionar la pastilla de cada tubo de 50 ml, las cuales se resuspendieron en 1 ml de TBII (Buffer de Transformación II; MOPS 10mM, CaCl₂ 75mM, RbCl 10mM, glicerol 15 % y ajustado a pH 7.0 con NaOH). Para tener un mejor manejo de las células competentes se transfirieron alícuotas de 200 μ l a microtubos de 1.5 ml fríos. Estas alícuotas se conservaron a -70°C (bajo estas condiciones las células son estables por lo menos durante 6 meses).

3.2.4 TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DH5 α DE *E. coli* POR CHOQUE TERMICO

El método por el que el ADN exógeno es introducido en las células competentes de la cepa DH5 α se denomina transformación. Para la transformación de las células competentes, se tomaron de 1 a 5 μ l del producto de la ligación pOO2/OsHKT2;3 y se agregaron a 20 μ l ó 50 μ l de células competentes, mezclándose y dejándose reposar durante 45 min a 4°C. A continuación, a las células se les dio un choque térmico a 37°C durante 45 seg. Se retiraron del baño y se les agregó 0.5 ml de medio LB fresco. Se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación, para que se expresara el vector. Posteriormente, las células de *E. coli* se sembraron en cajas Petri con medio LB/Ampicilina (20 μ g/ml) (las colonias que crecieron en estas placas contenían el vector con el inserto, ya que el vector posee resistencia a ampicilina; pero también crecieron colonias que solo contenían el vector, debido a la circularización del mismo) y se incubaron en una estufa a 37°C durante toda la noche.

Para corroborar la ligación del gen OsHKT2;3 con el vector pOO2, se extrajo ADN de colonias y se hicieron dobles digestiones de cada ADN extraído de las diferentes colonias con las enzimas de restricción NcoI y KpnI de tal manera que se liberó algunos ADN extraídos el inserto OsHKT2;3, demostrando que la construcción se realizó satisfactoriamente.

Las reacciones de PCR para la inserción de los sitios de restricción NcoI y KpnI se hicieron con la Taq DNA polimerasa platinum siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen, Co. USA). Las condiciones de amplificación fueron:

Primera desnaturalización del ADN	94°	5 min
Desnaturalización del ADN	94°	1 min
Tm	55°	1 min
Extensión	72°	2 min
Ultima extensión	72°	10 min

3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm DE OsHKT1;3 Y OsHKT2;3 DEL ARROZ.

La expresión de los transcritos para OsHKT2;3 y OsHKT1;3 se analizó en condiciones de deficiencia de K⁺ y salinidad (30 mM de NaCl). Las plantas se crecieron en medios hidropónicos conteniendo la solución de Hoagland al 50%. Después de seis semanas, las plantas se dividieron en tres lotes, uno expuesto al mismo medio para las plantas control, al segundo se les removió el K⁺ del medio y se expuso durante 24 h a esta condición, y al tercero se le suplementó con 30 mM de NaCl y las plantas se trataron durante 40 h. Al final de los tratamientos, y para obtener el ARNm se obtuvieron 300 mg de tejido, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Posteriormente, se extrajo el ARN total de las hojas y de la raíz, por separado con Trizol siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen Co. USA). Una vez obtenido el RNA total se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción. Para ello a 5 µg de RNA total se le agregó el oligo (dT) en una concentración de 500 µg/ml para obtener el cDNA de los mensajeros. Posteriormente se siguieron las recomendaciones del proveedor para terminar la retrotranscripción (Invitrogen, Co. USA). Con este cDNA se llevaron a cabo las reacciones de PCR con oligos diseñados en zonas no conservadas de los transportadores OsHKT1;3 y OsHKT2;3 (Tabla 2). La cuantificación de la abundancia de los transcritos de OsHKT1;3 y OsHKT2;3 se realizó en geles de agarosa al 0.8 % midiendo la intensidad de brillo de los productos de PCR de cada muestra provocada por la tinción con bromuro de etidio, empleando el software ImageJ. Para poder cuantificar la abundancia del transcrito bajo las diferentes condiciones estudiadas (deficiencia de K⁺, 30 mM NaCl y control) se hizo la cuantificación del transcrito en la fase exponencial de la reacción de PCR, que para OsHKT1;3 de 29 ciclos y para OsHKT2;3 de 35 ciclos. Para normalizar los resultados se utilizó a OsRAC1 el gen que codifica para una actina previamente reportada por Buñuelos *et al.* (2002) y que se expresa constitutivamente. Las condiciones de las reacciones de PCR fueron las siguientes:

Primera desnaturalización del ADN	94°	2 min
Desnaturalización del ADN	94°	30 s
Tm	60°	60 s
Extensión	72°	1 min
Ultima extensión	72°	10 min

3.4 TRANSFORMACIÓN DE LA MUTANTE *Athkt1;1* DE *A. thaliana*

Para transformar las mutantes de Arabidopsis se utilizó el método de infiltración floral al vacío. Las plantas mutantes de Arabidopsis (*Athkt1;1-1*) se crecieron en macetas conteniendo suelo experimental (Metro Mix 500 2:1 Peat Moss Canadian Sphagnum, Prod. Bork Ash), regándose diariamente con agua común, y mantenidas bajo condiciones controladas de invernadero, 14 y 25 °C en periodo de oscuridad y luz, respectivamente. Las plantas fueron fertilizadas con solución Hoagland una vez por semana.

Para el evento de transformación se emplearon plantas en estadios tempranos de floración, sumergiendo la zona donde se encuentran las flores en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* crecida en medio LB con rifampicina (100 µg/ml) la cual contenía a uno de los ORF de los OsHKT de interés. Se aplicó vacío y las plantas se dejaron desarrollar para obtener semillas. Estas semillas se germinaron en cajas Petri con medio mínimo para crecimiento de *A. thaliana* (0.8 % bacto agar y 1 mM de KNO₃) conteniendo higromicina (20µg/ml) como medio de selección para aquellas plantas que fueron transformadas por *Agrobacterium* y que incorporaron el inserto del T-DNA, estas plantas corresponden a la generación T1. A continuación se autofecundaron las plantas de la T1 y se colectaron las semillas de esta primera generación. Posteriormente, las semillas de cada línea germinal, es decir, las semillas provenientes de cada planta se germinaron en medio mínimo de crecimiento con higromicina por separado. Las semillas de cada línea se germinaron y se analizó el porcentaje de germinación para determinar cuales de ellas correspondieron a líneas homocigas que expresaron el transgen OsHKT. Para comprobar que los genes OsHKT2;3 y OsHKT1;3 se expresaron en las plantas transgenicas se empleo la técnica de RT-PCR.

3.5 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Las plantas de *Oryza sativa* cv Pokkali se obtuvieron a partir de semillas germinadas en charolas con arena, y se mantuvieron en la oscuridad (28 °C). Dos semanas después de la germinación, las plantas fueron transferidas en vasos opacos de 1L (cultivos hidropónicos) con la solución nutritiva de Hoagland's (0.5 mM $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, 3 mM KNO_3 , 2 mM $\text{Ca} (\text{NO}_3)$, 1 mM MgSO_4 , 12 μM H_3BO_3 , 8 μM MnSO_4 , 0.38 μM ZnSO_4 , 1.76 μM CuSO_4 , 0.041 μM H_2MoO_4 , 0.11 mM Na_2EDTA , 0.1 mM FeSO_4 ; Hoagland y Arnon, 1938), diluida a la mitad de su concentración (Vera-Estrella *et al.*, 1999; Barkla *et al.*, 2002) y se mantuvieron en condiciones de invernadero. Seis semanas después de la germinación se dio inicio al tratamiento de las plantas. Los tratamientos se realizaron mediante la adición de 30 mM NaCl por 40 h. Para los tratamientos sin K^+ , el KNO_3 fue sustituido con NH_4NO_3 .

En la siguiente fotografía se muestran algunos tejidos de la planta de arroz:

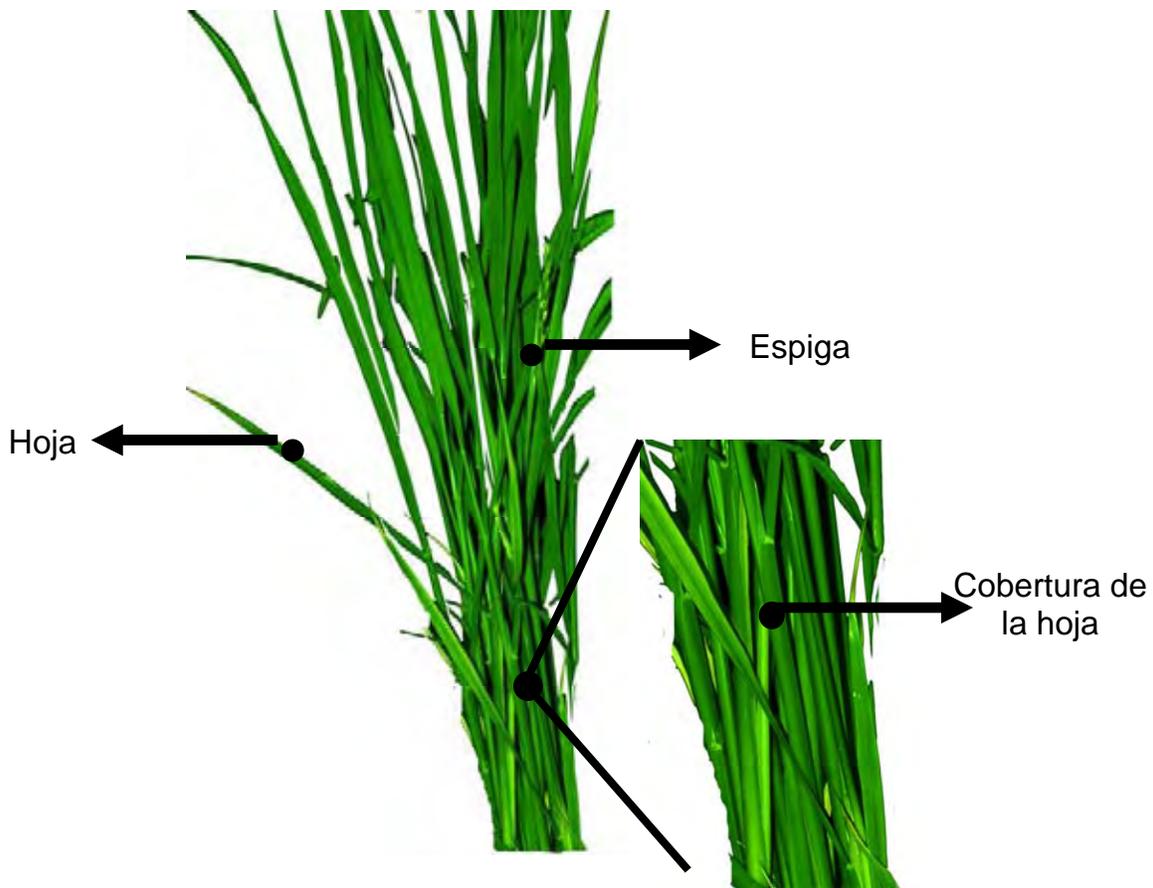


Figura 4. Planta de arroz. La figura muestra algunos tejidos de la parte aérea.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL TRANSPORTADOR OsHKT1;3

Para determinar la función del transportador OsHKT1;3, se hicieron registros electrofisiológicos en los ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaron OsHKT1;3 mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos. Los ovocitos inyectados con el ARN de OsHKT1;3 se les fijó el potencial de membrana (potencial de mantenimiento) igual al potencial de reposo registrado en la solución 00 para mantener un nivel de corriente cero y se perfundieron con K^+ 0.3 mM, Na^+ 1mM y Na^+ 1mM + K^+ 0.3 mM. Al perfundir la solución de 0.3 mM de K^+ sobre el ovocito, el nivel de la corriente se mantuvo constante (Figura 5 A); sin embargo al fluir la solución de 1 mM de Na^+ , se registró una corriente entrante (corriente negativa) de aproximadamente -127 nA que regresó a su nivel inicial al exponer al ovocito a la solución 00 inicial (Figura 5A). El potencial de membrana al cual se mantuvo el ovocito fue de -140mV. Existen reportes previos que muestran que el potencial de membrana de las células vegetales se encuentra entre -100 y -200 mV (Mohr y Schopfer 1995), lo que indica que la actividad registrada en los ovocitos se realizó en condiciones similares a las que OsHKT1;3 estaría expuesto en una célula vegetal. Para nosotros fue importante trabajar con todos aquellos ovocitos que tuvieran potenciales más negativos a -100 mV, esto con la finalidad de poder demostrar que existen similitudes en los potenciales de membrana entre los ovocitos de *X. laevis* y las células vegetales facilitando la interpretación del posible funcionamiento de este transportador en las plantas. Para determinar si OsHKT1;3 funcionaba como un co-transportador Na^+/K^+ de forma similar a lo reportado para el transportador HKT1 de trigo (*TaHKT2;1*), se perfundió una solución de Na^+ 1 mM + K^+ 0.3 mM sobre el ovocito, observándose una corriente negativa de aproximadamente -127 nA, valor similar al registrado en presencia de sólo Na^+ (Figura 5A). Las corrientes negativas registradas al perfundir tanto la solución de Na^+ 1 mM como la solución de Na^+ 1 mM + K^+ 0.3 mM regresaron a su nivel inicial (cero nA) cuando se reemplazaron por la solución 00 (esta solución no contiene K^+ ni Na^+). Al realizar el mismo tipo de experimentos en ovocitos control

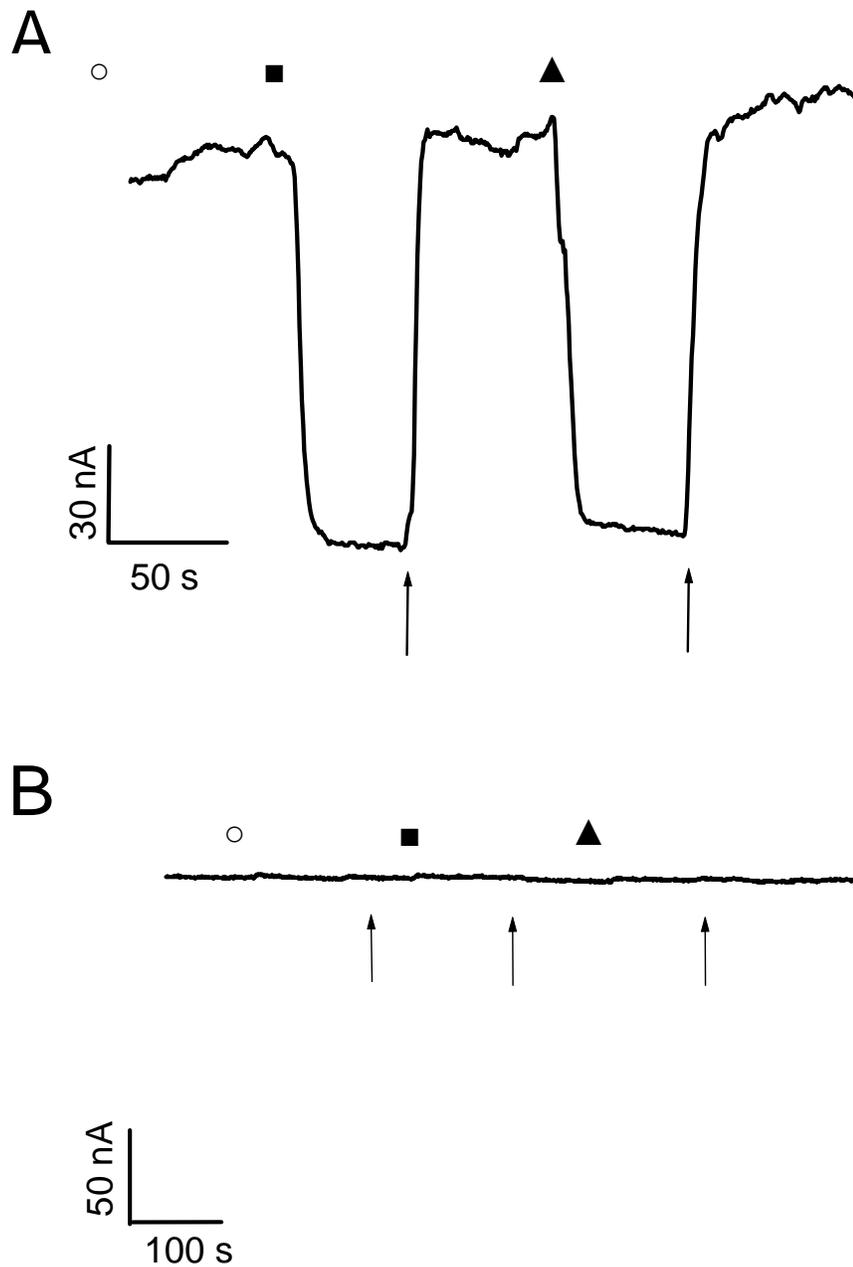


Figura 5. OsHKT1;3 es un mecanismo de transporte de Na⁺. **A)** Registro original de las corrientes causadas por la exposición de un ovocito inyectado con el ARN de OsHKT1;3 a 0.3 mM de K⁺ (○), 1 mM de Na⁺ (■) y la presencia simultánea de Na⁺ 1 mM + K⁺ 0.3 mM (▲). El potencial de mantenimiento fue de -140 mV. Registro original representativo de una n=10 de 4 diferentes ranas. **B)** Registro original que muestra la ausencia de la activación de corrientes por la exposición de un ovocito control inyectado con H₂O-DEPC a las mismas soluciones que en **A**. El potencial de mantenimiento del ovocito fue de -125 mV. Las flechas indican el momento en que los iones se removieron.

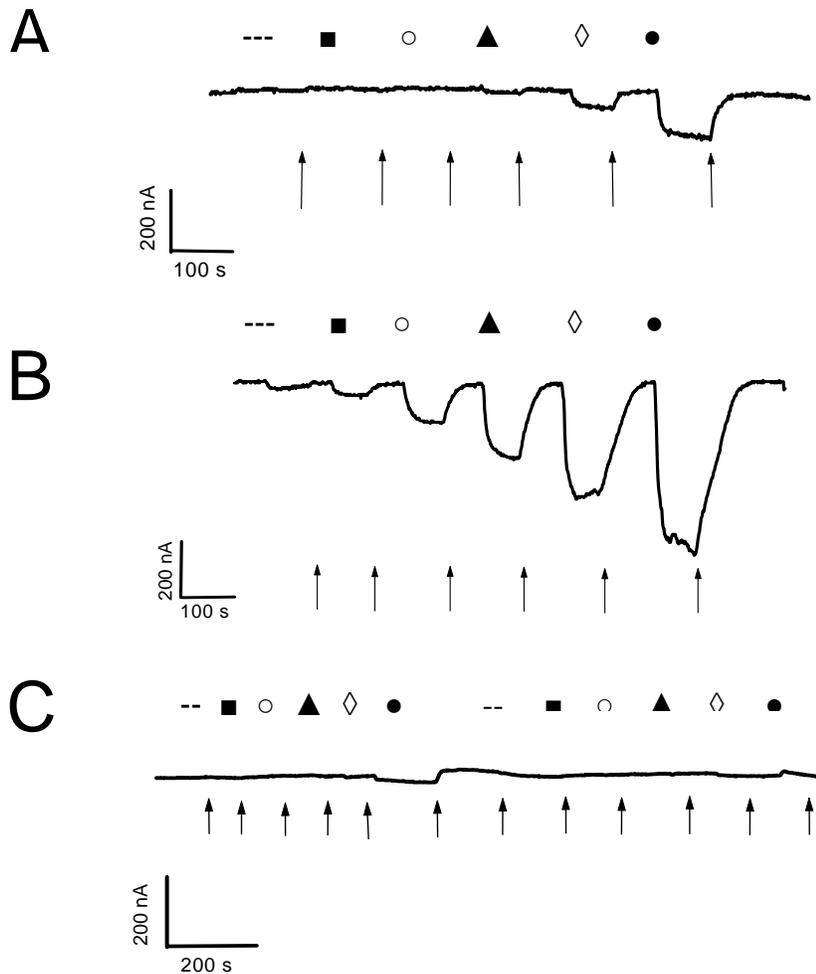


Figura 6. OshKT1;3 es más selectivo al Na⁺ que al K⁺. **A)** Registro de un ovocito inyectado con el ARN de OshKT1;3 que fue perfundido con diferentes concentraciones de K⁺ en el medio extracelular. Registro representativo de una n=14 de 4 diferentes ranas. **B)** Mismo ovocito, perfundido con diferentes concentraciones de Na⁺ (n=13 en 4 diferentes ranas). **C,** Ovocito control inyectado con agua-DEPC perfundido con las mismas soluciones que en **A** y en **B**. Los símbolos (---, ■, ○, ▲, ◇ y ●) corresponden a las soluciones de 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 mM, respectivamente. El potencial al cual se fijaron los ovocitos inyectados con ARN de OshKT1;3 y los inyectados con agua-DEPC fue de -145 y -125 mV, respectivamente. Las flechas indican el momento en que los iones se removieron.

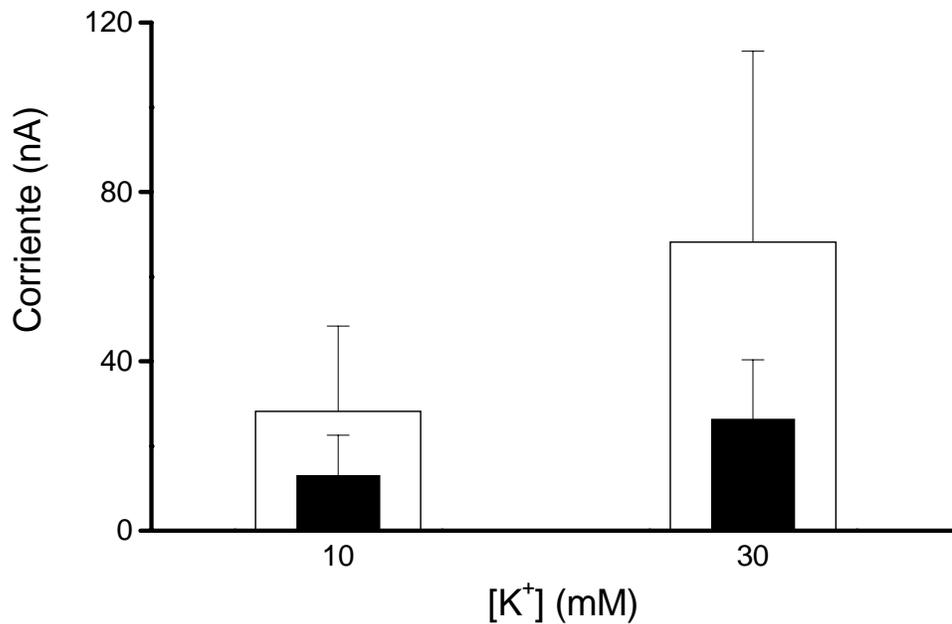


Figura 7. Los ovocitos control poseen corrientes endógenas entrantes de K⁺. En barras blancas se muestra la corriente que se generó a 10 y 30 mM de K⁺ en ovocitos inyectados con ARN de OsHKT1;3. En barras color negro se muestra la corriente que se generó bajo las mismas concentraciones de K⁺ en ovocitos inyectados con H₂O-DEPC. Los datos que se muestran son la media ± DS de once repeticiones.

inyectados con agua-DEPC, el flujo de las diferentes soluciones no activó corriente alguna (Figura 5 B) lo cual reforzó el resultado de que las corrientes registradas en los ovocitos inyectados con el ARN de OsHKT1;3 se debían a la actividad de este transportador y no a corrientes endógenas del ovocito (Figura 5B).

Con el objetivo de determinar la afinidad del transportador OsHKT1;3 a Na^+ y a K^+ se perfundieron soluciones conteniendo diferentes concentraciones de ambos iones en forma separada (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 mM). Al perfundir las soluciones que contenían diferentes concentraciones de K^+ sobre un ovocito inyectado con ARN de OsHKT1;3 y con un potencial de mantenimiento de -150 mV sólo se generaron corrientes entrantes de pequeña magnitud a partir de 10 mM de K^+ , alcanzando niveles de corriente de -140 nA a una concentración de 30 mM de K^+ (Figura 6A). No obstante, al perfundir al mismo ovocito con soluciones de diferentes concentraciones de Na^+ y con un potencial de mantenimiento similar (-145 mV) las corrientes negativas generadas fueron de mayor magnitud, ya que una diferencia en la corriente fue apreciable desde una solución de Na^+ 0.3 mM. La magnitud de las corrientes entrantes aumentó conforme la concentración extracelular de Na^+ se incrementó hasta 30 mM, donde fue posible registrar corrientes entrantes de -580 nA (Figura 6B). En estos experimentos nuevamente vimos que las corrientes negativas desaparecían conforme se reemplazaban las soluciones que contenían las diferentes concentraciones de Na^+ por la solución 00, corroborando que el movimiento de Na^+ a través de la membrana del ovocito es resultado de la expresión del transportador OsHKT1;3 en los ovocitos. Como control siempre se usaron ovocitos inyectados con H_2O -DEPC para descartar que estas corrientes fueran generadas por canales o transportadores endógenos del ovocito. Al fluir las mismas concentraciones de Na^+ sobre los ovocitos inyectados con agua y con un potencial de mantenimiento de -125 mV no se registraron cambios en el nivel de la corriente inicial (Figura 6C). Por otro lado al fluir las mismas concentraciones de K^+ sobre los ovocitos control se llegó a registrar corrientes entrantes a partir de 10 mM de K^+ . Estos resultados, muestran que hay transportadores de K^+ endógenos en los ovocitos control, causando incertidumbre en la magnitud real de las corrientes debidas a OsHKT1;3. Sin embargo

comparando la magnitud de las corrientes entrantes registradas en ovocitos control con aquellas registradas en ovocitos inyectados con OsHKT1;3, se observó que la magnitud de las corrientes generadas por K^+ en los ovocitos inyectados con OsHKT1;3 fueron ligeramente mayores. Estos datos sugieren que el transporte de K^+ realizado por OsHKT1;3 es mínimo (Figura 7).

Utilizando los valores de las corrientes activadas por las diferentes soluciones de Na^+ y K^+ (Figura 6A y 6B) se determinó la afinidad del transportador OsHKT1;3 por éstos, al graficar los niveles de corriente contra la concentración (Figura 8). Analizando esta grafica con la ecuación de Michaelis-Menten se obtuvo una $K_m = 3.8 \pm 0.4$ mM con una velocidad máxima de transporte de $V_{max} = 418 \pm 11$ nA para el Na^+ (Figura 8 A). De acuerdo a Epstein y colaboradores (1963) una K_m en el rango milimolar clasifica al transportador OsHKT1;3 como un transportador de baja afinidad a Na^+ . La V_{max} nos muestra la eficiencia de operación de OsHKT1;3, la cual fue variable de un ovocito a otro debido principalmente a la variación en la expresión del transportador. En los ovocitos no se puede controlar la cantidad de proteína de OsHKT1;3 ya que la cantidad de transportador depende directamente de la maquinaria traduccional del ovocito. Por otro lado, no se pudo determinar la K_m para K^+ con las concentraciones empleadas ya que los valores no se ajustaron a una cinética tipo Michaelis-Menten, debido a que sólo se pudieron registrar corrientes entrantes a concentraciones por arriba de 10 mM (Figura 8A y 8B).

Para obtener mayor información sobre la selectividad de OsHKT1;3, se procedió a obtener la variación del potencial de inversión (ΔE_r) de las corrientes debidas tanto a Na^+ como a K^+ , conforme se varió la concentración extracelular de estos cationes, mediante la aplicación de rampas de voltaje. Durante estos experimentos, el potencial de membrana se varió de forma constante entre dos valores de potencial que fueron de -200mV a +30 mV con una velocidad de 70 mV/s. En este intervalo se esperaba encontrar el potencial de inversión bajo las diferentes condiciones experimentales. De acuerdo a la ecuación de Nernst, el potencial de membrana se desplazará positivamente 60 mV por un incremento de 10 veces la concentración, si el transportador es muy selectivo al cation

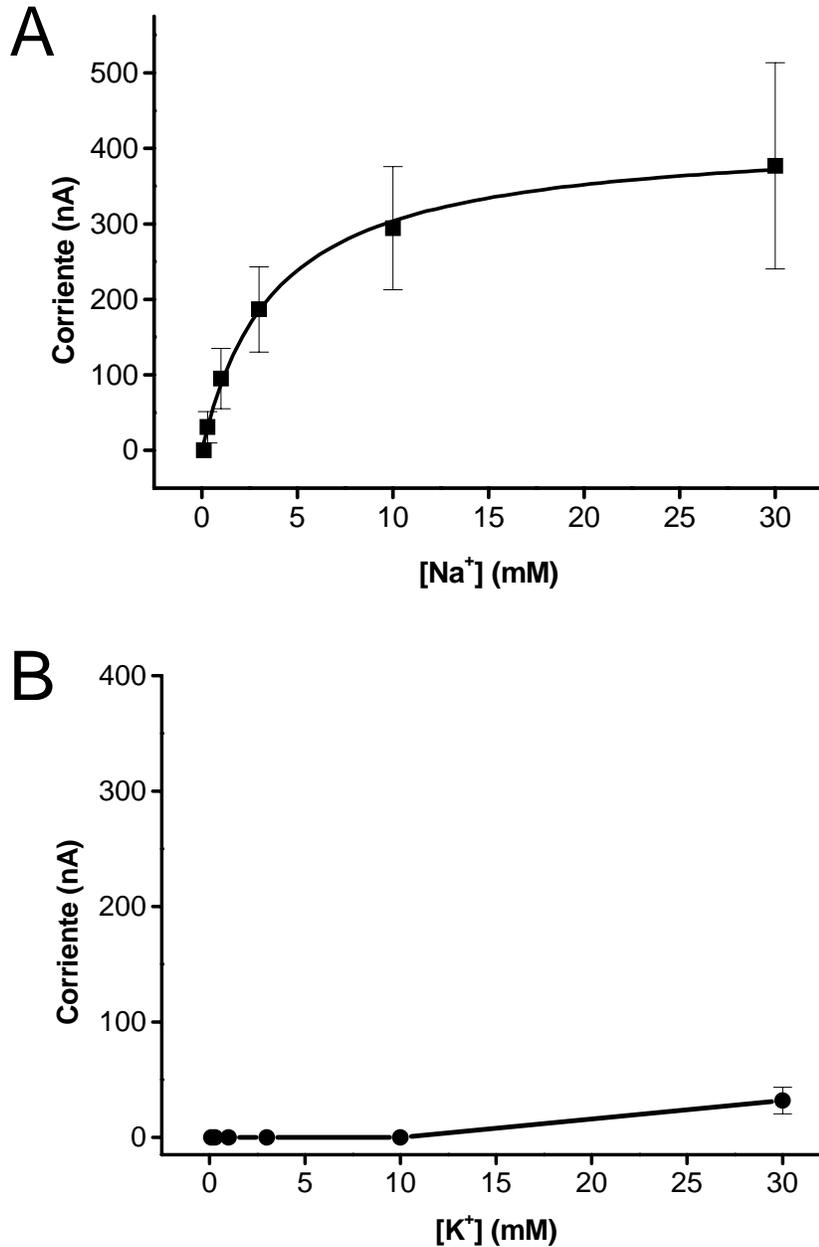


Figura 8. OshKT1;3 tiene una mayor afinidad a Na⁺ que a K⁺. Las corrientes generadas por las diferentes concentraciones de Na⁺ (**A**) y de K⁺ (**B**) se ajustaron a una cinética tipo Michaelis-Menten. La K_m calculada para Na⁺ fue 3.8 ± 0.4 mM y una $V_{max} = 418 \pm 11$ nA. Las corrientes negativas generadas por K⁺ (**B**) no se pudieron ajustar a una cinética de tipo Michaelis-Menten. Promedio de 10 y 6 experimentos de 4 diferentes ranas en **A** y **B**, respectivamente.

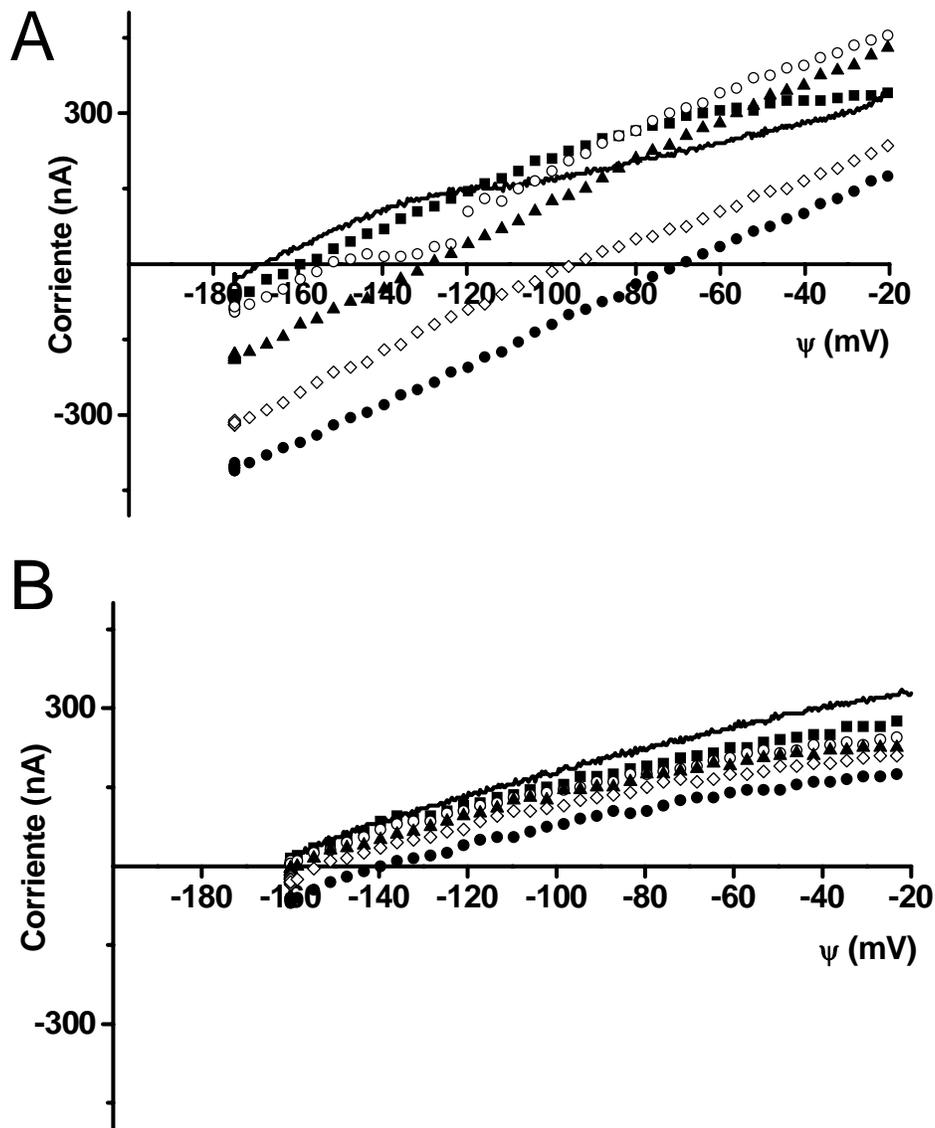


Figura 9. Cambios en E_r dependientes de las concentraciones extracelulares de Na^+ o K^+ . Las curvas corriente-voltaje muestran los potenciales de inversión (E_r), obtenidos mediante la aplicación de rampas de voltaje. Estas curvas se obtuvieron de ovocitos inyectados con ARN de OsHKT1;3 expuestos a diferentes concentraciones (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 mM que corresponden a los símbolos ---, ■, ○, ▲, ◇ y ●) de Na^+ (A) o K^+ (B). Los potenciales de mantenimiento fueron de -165 mV y -150 mV para A) y B), respectivamente. $n=10$ de 5 ranas diferentes. Las rampas de voltaje se iniciaron en -200 mV y se terminaron en +30 mV a una velocidad de 70 mV/s.

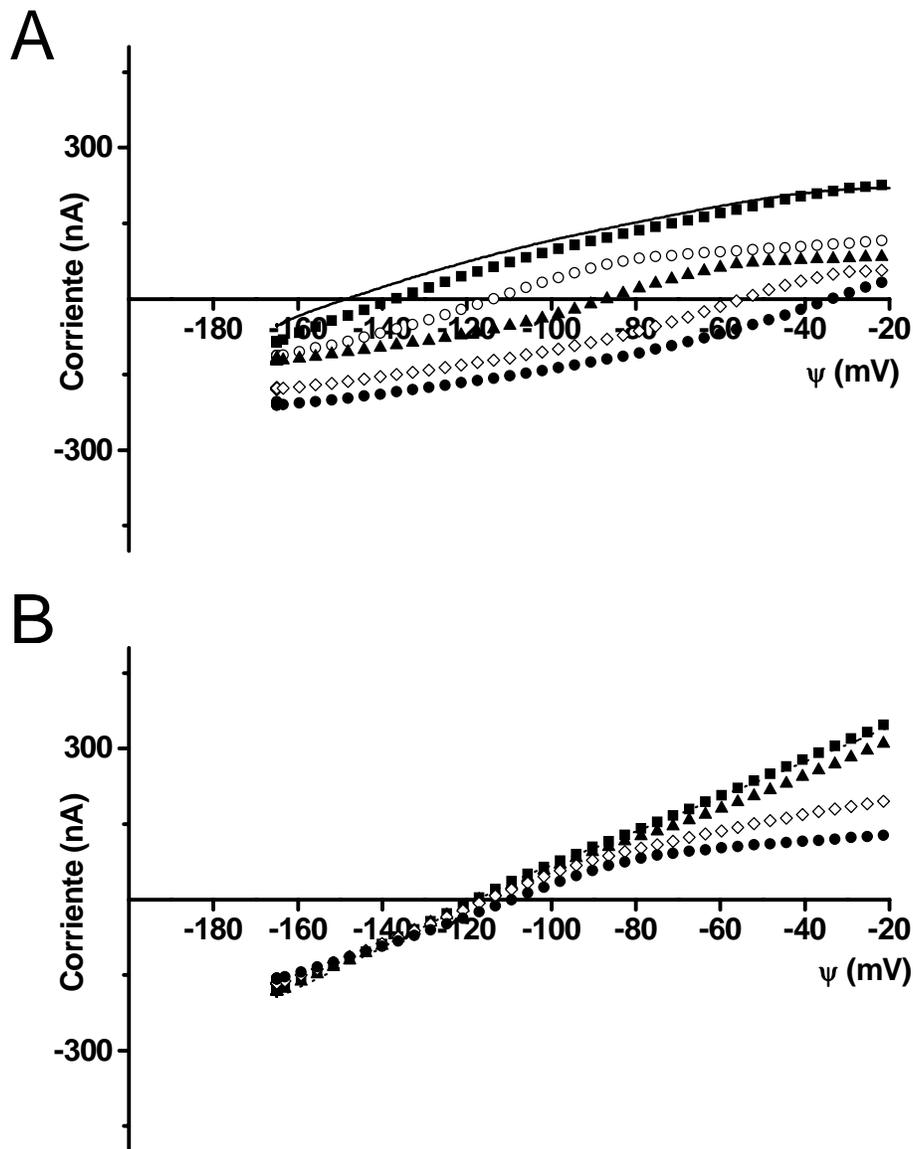


Figura 10. La presencia simultanea de K^+ y Na^+ no afecta los cambios en el potencial de inversión. A) Curvas corriente-voltaje causadas por las diferentes concentraciones de Na^+ (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 mM que corresponden a los símbolos ---, ■, ○, ▲, ◇ y ●) en presencia de 1 mM de K^+ . **B)** curvas corriente-voltaje en presencia de 1 mM de Na^+ y diferentes concentraciones de K^+ (los símbolos ---, ■, ○, ▲, ◇ y ● representan las concentraciones de 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 mM de K^+ , respectivamente). Los potenciales de mantenimiento fueron de -155 mV tanto para **A)** como para **B)**. Muestras representativas de una $n=7$ y $n=6$, en **A)** y **B)**, respectivamente de 4 ranas diferentes.

monovalente presente en el medio extracelular. También mediante estos experimentos es posible determinar si la presencia conjunta de Na^+ y K^+ promueve el co-transporte o inhibe el transporte como se ha visto que sucede en otros transportadores HKT (Rubio *et al.*, 1995; Horie *et al.*, 2007) y con ello tener más evidencia de la función en este transportador.

En la Figura 9A se observa que conforme las concentraciones de Na^+ en el medio extracelular se aumentaron entre 0.1 y 30 mM, se registró un desplazamiento positivo en el potencial de inversión, que fue de 57 mV y de 59 mV, entre las concentraciones de 1 a 10 mM y de 3 a 30 mM de Na^+ , respectivamente. En la figura 9A también se puede apreciar un incremento en la magnitud de la corriente negativa conforme se aumentó la concentración de Na^+ . Estos registros obtenidos de ovocitos inyectados con el ARN de *OshKT1;3* demuestran que existe una gran selectividad por Na^+ y, que el valor del cambio en el ΔE_r fue muy cercano al valor teórico. Por otro lado, la figura 9B muestra que las variaciones en el ΔE_r fueron mucho menores en presencia del ion K^+ . El ΔE_r entre 3 y 30 mM de K^+ fue de 19 mV. Este resultado apoya, al igual que la figura 7, que a concentraciones por arriba de 10 mM de K^+ existe el flujo de este ión hacia el citoplasma del ovocito. Pudiéndose sugerir que este flujo está determinado por la presencia de los canales endógenos de los ovocitos control y no por la actividad del transportador *OshKT1;3*. Estos registros reafirman que *OshKT1;3* transporta preferentemente a Na^+ en comparación con K^+ .

Aún y cuando nuestros resultados iniciales nos indicaban que *OshKT1;3* no funcionaba como un co-transportador Na^+/K^+ (Figura 5A), se procedió a estudiar si las corrientes debidas a Na^+ o K^+ pudieran modificarse por la presencia conjunta de otro cation, es decir, tener en el medio extracelular Na^+/K^+ y/o si la selectividad iónica, especialmente la de Na^+ , se veía afectada por la presencia de K^+ . Para esto se mantuvo constante la concentración de un ion (1 mM) y se varió la concentración del segundo (0.1 mM a 30 mM). En experimentos donde la concentración de K^+ se mantuvo constante y se variaron las concentraciones de Na^+ , el ΔE_r fue de 53 mV entre 1 y 10 mM y de 60 mV entre 3 a 30 mM de Na^+ (Figura 10A). Nuevamente, se puede observar que la magnitud de las corrientes

negativas también aumentó a la par con el incremento de las concentraciones de Na^+ (comparar figuras 9A y 10A). De manera totalmente diferente, variaciones en las concentraciones de K^+ en el medio extracelular entre 3 y 30 mM en presencia de 1 mM de Na^+ constante, generó un cambio menor en ΔE_r (6mV) (Figura 10B). En esta figura también se puede apreciar que los aumentos en la concentración de K^+ no causaron cambios importantes en la magnitud de las corrientes entrantes, la cual se mantuvo cercana a aproximadamente -170 nA, valor muy similar al registrado en presencia de sólo 1 mM de Na^+ , lo cual indica que aún con concentraciones hasta 30 veces mayores de K^+ , OshKT1;3 transporta con preferencia a Na^+ . Estos resultados confirman la alta selectividad de este transportador hacia el Na^+ (Figuras 5, 6, 8, 9 y 10). Aparentemente, por lo que se muestra en las figuras 9A y 10A, la selectividad de OshKT1;3 a Na^+ no se afecta por la presencia simultánea de K^+ . Para confirmar esta observación, se graficaron los valores de E_r obtenidos con cada una de las concentraciones de Na^+ en ausencia y en presencia de 1 mM de K^+ (Figura 11). En esta grafica se puede observar que en ambas condiciones, E_r varió en forma lineal con el logaritmo de la concentración de Na^+ . El análisis de los datos mediante un ajuste lineal nos permitió calcular un valor de las pendientes de 55 y de 50 mV por cada diez veces el incremento de las concentraciones, en soluciones de sólo Na^+ y Na^+ + 1 mM K^+ , respectivamente (Figura 11). Este análisis muestra que la selectividad de OshKT1;3 hacia Na^+ no cambia cuando el K^+ se encuentra presente en el medio extracelular, corroborando que OshKT1;3 es altamente selectivo a Na^+ .

Como se observa en la figura 8A, el aumento en las concentraciones extracelulares de Na^+ causaron un incremento en los niveles de corriente, sin embargo, es importante determinar si éstas corrientes son transportadas con la misma facilidad a través de OshKT1;3. La cuantificación de la conductancia en OshKT1;3 se calculó mediante la obtención de las pendientes de las rampas I-V entre -200 y -120 mV a cada una de las concentraciones empleadas (1-30 mM) de Na^+ .

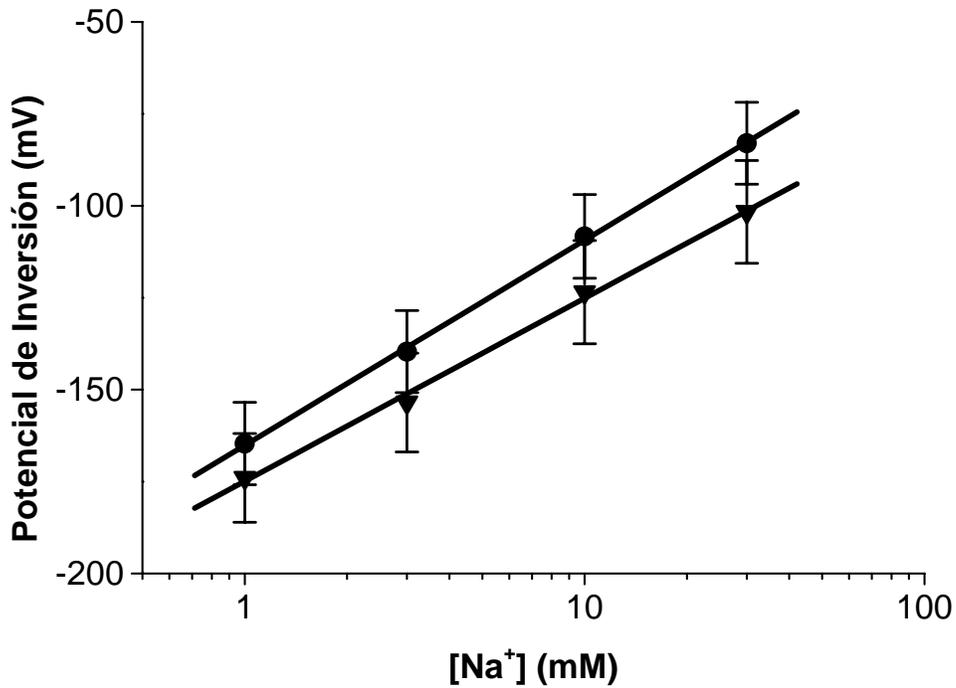


Figura 11. OsHKT1;3 es un transportador altamente selectivo a Na⁺.

Variaciones del potencial de inversión (E_r) contra la concentración extracelular de Na⁺ en ausencia (●) y en presencia de 1 mM de K⁺ (▼). Se observa que la pendiente de ambas líneas es muy similar, obteniéndose una variación de 55 mV por década de concentración de Na⁺ en (●) y de 50 mV en (▼) (n=6).

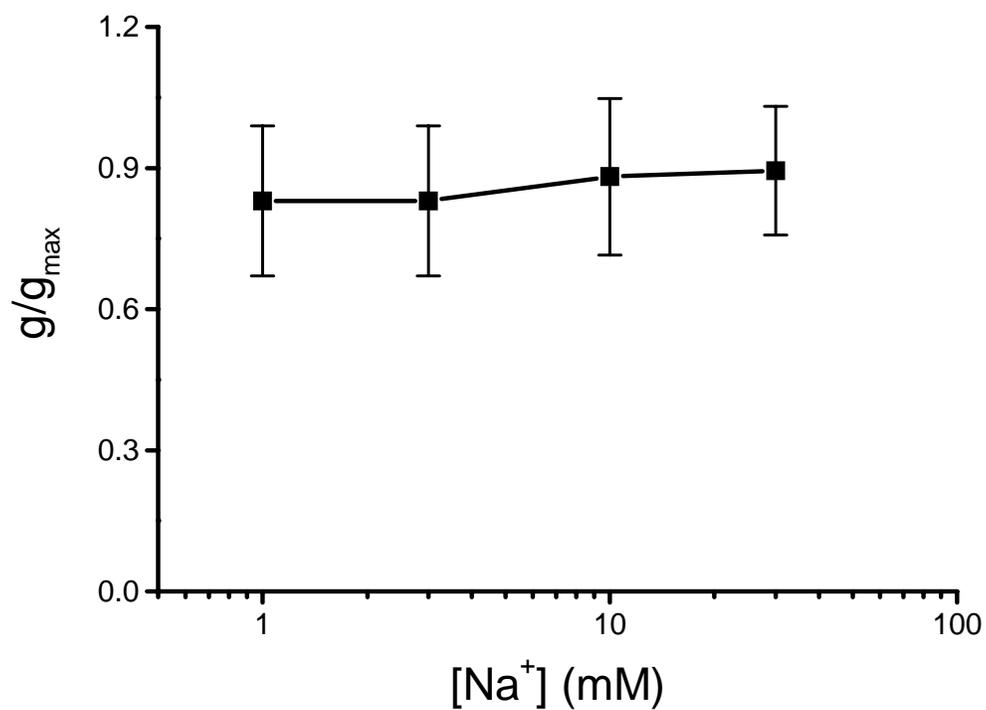


Figura 12. La conductancia de *OshKT1;3* es independiente de la concentración extracelular de Na^+ . La conductancia se mantuvo a un valor constante, cercano a $4 \mu\text{S}$. Los valores están normalizados a la g_{\max} obtenida en cada concentración. Los datos son la media \pm DS de ocho repeticiones.

La figura 12 muestra que la conductancia es independiente de las concentraciones extracelulares de Na^+ siendo de 3.83, 4.03, 4.32 y 4.38 μS para 1, 3, 10 y 30 mM de Na^+ , respectivamente.

Los resultados anteriores nos mostraron que OsHKT1;3 es altamente selectivo a Na^+ , sin embargo, por arriba de 10 mM se registro corrientes entrantes cuando se perfundió al K^+ . Este último dato nos llevó a preguntarnos si este transportador pudiera ser permeable a otros cationes monovalentes (Cs^+ , Li^+ , y Rb^+). En la figura 13A se muestra que a una concentración de 10 mM, OsHKT1;3 puede transportar a todos los cationes alcalinos, pero el Na^+ fue el cation alcalino que generó la mayor corriente entrante. De acuerdo a nuestros resultados, OsHKT1;3 muestra la siguiente secuencia de permeabilidades: $\text{Na}^+ \gg \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li}^+$ (Figura 13C). Al hacer estos mismos experimentos en ovocitos inyectados con agua-DEPC se registraron corrientes entrantes muy similares para todos los cationes y de menor magnitud que las registradas en los ovocitos que expresaron a OsHKT1;3 (Figura 13 B y C). Si bien se observó una corriente entrante de aproximadamente 50 nA al perfundir los diferentes cationes, muy probablemente esta corriente se deba a la actividad del canal de cloro presente en los ovocitos, ya que en estos experimentos se emplearon sales de cloro.

Para confirmar que Na^+ fue el cation monovalente transportado con preferencia por OsHKT1;3 se aplicaron rampas de voltaje a los ovocitos y observamos que solo Na^+ fue el cation alcalino que causó un cambio en el E_r , mientras que el resto de los cationes alcalinos no afectó el E_r (figura 14A). También notamos que al perfundir la solución de Na^+ se registró un aumento en la corriente entrante, mientras que para los demás cationes la corriente permaneció sin cambios. Realizando el mismo tipo de experimentos en ovocitos control (Figura 14B) donde se muestra que el E_r para todos los cationes alcalinos permanece sin cambio, así como los niveles de corriente entre los diferentes cationes permanecen similares. Estos resultados corroboran que OsHKT1;3 tiene una gran selectividad por Na^+ .

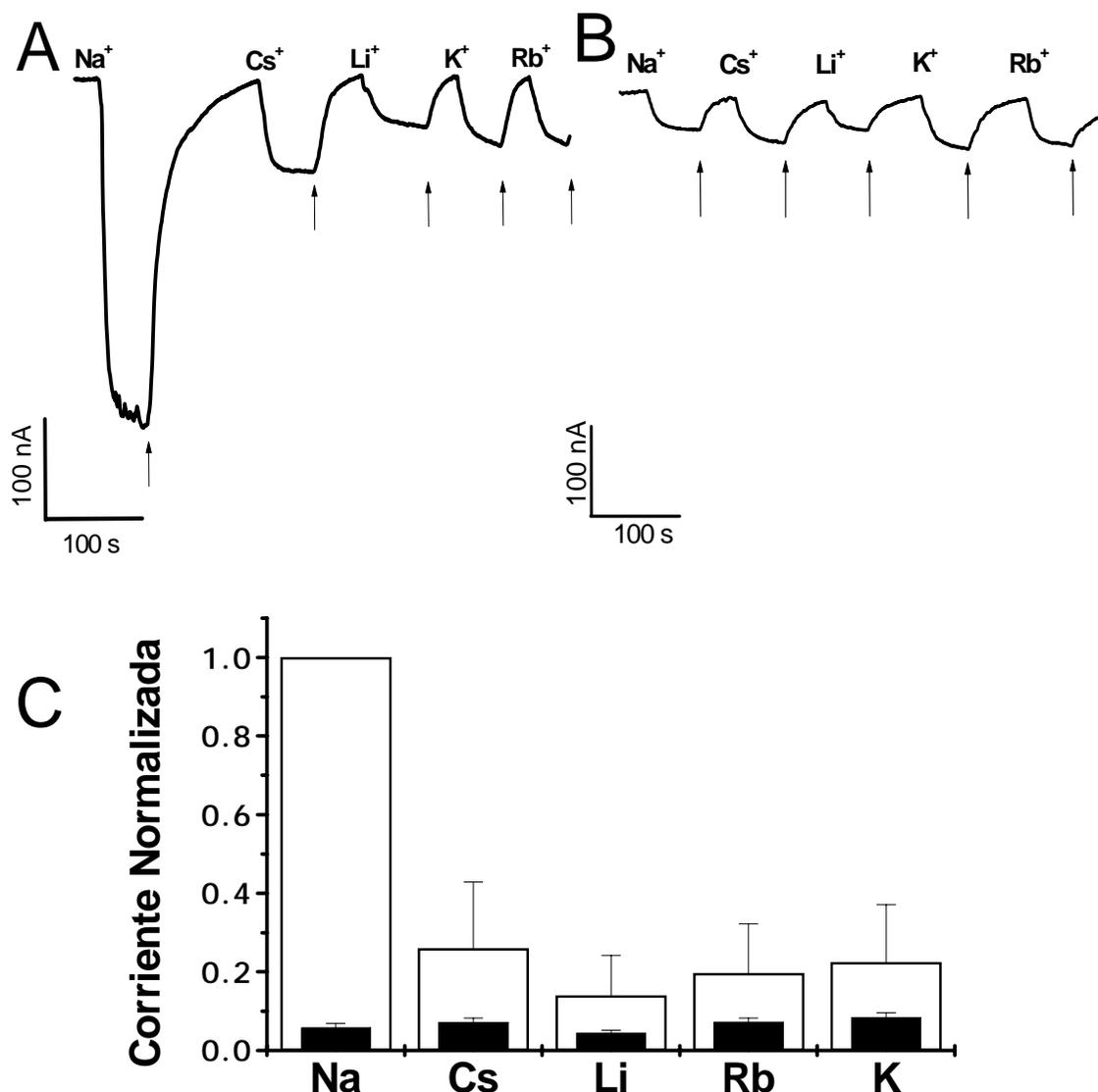


Figura 13. Selectividad de OshKT1;3 hacia los cationes alcalinos. **A)** Registro original de las corrientes generadas en ovocitos inyectados con el ARN de OshKT1;3 por la presencia de los diferentes cationes monovalentes (10 mM, Cs⁺, Li⁺, K⁺, Na⁺ y Rb⁺). **B)** Corrientes generadas por la presencia de los diferentes cationes monovalentes en un ovocito inyectado con agua-DEPC. **C)** Normalización \pm ES de la corriente generada por cada uno de los diferentes cationes monovalentes en ovocitos inyectados con ARN de OshKT1;3 y agua-DEPC. (n=9) de tres diferentes ranas. En estos experimentos se usaron cloruros de los diferentes cationes monovalentes. El potencial de mantenimiento para **A)** y **B)** fue de -135 mV y -45 mV, respectivamente.

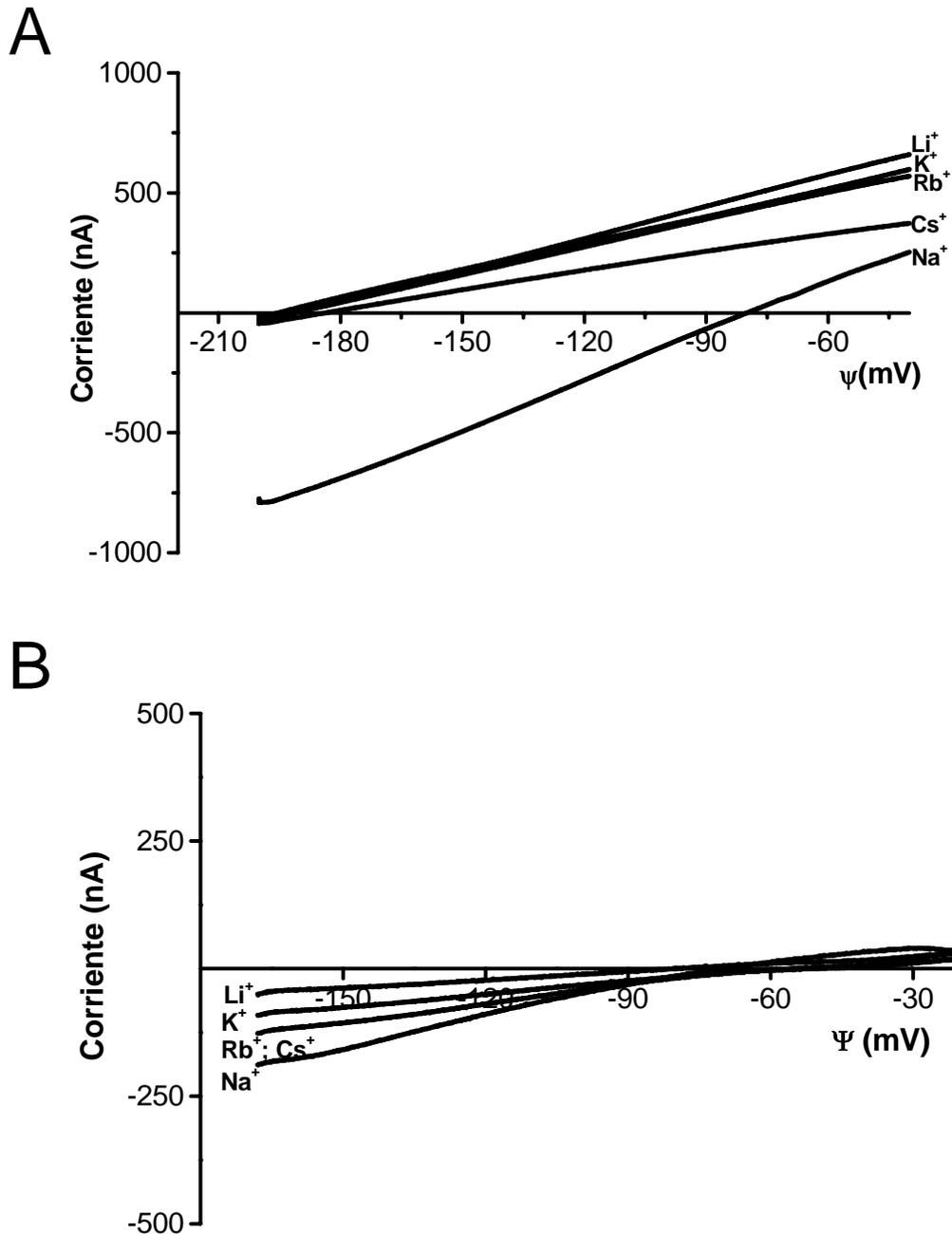


Figura 14. OshKT1;3 es selectivo a Na⁺. Registro original de las corrientes activadas por los diferentes cationes alcalinos a una concentración de 10 mM de cada cation alcalino y en respuesta a una rampa de voltaje de -200 a +35 mV con una velocidad de 70 mV/s. **A)** ovocito inyectado con el ARN de OshKT1;3. Obsérvese que el E_r sólo se desplazo a potenciales positivos en presencia de Na⁺. El potencial de mantenimiento fue de -190 mV. **B)** Ovocitos control profundidos con las mismas soluciones que en A) y con un potencial de mantenimiento de -120 mV. En estos experimentos se usaron cloruros de los diferentes cationes alcalinos. Observe las diferentes escalas para las corrientes en **A)** y **B)**.

4.2 CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL TRANSPORTADOR OsHKT2;3

Para la caracterización de las propiedades de transporte de OsHKT2;3 se volvió a usar el sistema heterólogo de los ovocitos de *X. laevis*. Con la finalidad de conocer si OsHKT2;3 era permeable a K^+ , se perfundió a los ovocitos inyectados con ARN de OsHKT2;3 con diferentes concentraciones (1, 3, 10 y 30 mM) de este cation. Los registros obtenidos de estos ovocitos mostraron la activación de corrientes entrantes de baja magnitud, la cual aumentó conforme se incrementó la concentración de K^+ (Figura 15A). Al repetir los mismos experimentos en ovocitos inyectados con H_2O -DEPC, se registraron corrientes negativas y éstas se fueron incrementando en magnitud a la par con el incremento de las concentraciones de K^+ (Figura 15B). Sin embargo, las corrientes registradas en ovocitos inyectados con ARN de OsHKT2;3 fueron ligeramente mayores con respecto a las registradas en ovocitos inyectados con H_2O -DEPC, registrando corrientes de hasta de -64 nA y -30 nA con 30 mM de K^+ , respectivamente.

Con la finalidad de saber si OsHKT2;3 era capaz de transportar al Na^+ se fluyeron diferentes concentraciones de este cation (3, 10, 30, 50 y 100 mM) en ovocitos inyectados con el ARN de OsHKT2;3. Los registros obtenidos de estos ovocitos mostraron la activación de corrientes entrantes (Figura 16A), cuya magnitud aumentó conforme se incrementó la concentración de Na^+ . Es importante mencionar que los niveles de corriente debidos a la expresión de OsHKT2;3 fueron menores que los registrados con OsHKT1;3 (comparar figuras 6 y 16). Como se puede observar en la figura 16A con 3 mM de Na^+ , se registró una corriente entrante de -3 nA, alcanzando un valor de -70 nA con 100 mM de Na^+ . Anteriormente no se habían realizado registros utilizando 100 mM de Na^+ así que dejamos fluir las mismas concentraciones de Na^+ en ovocitos inyectados con H_2O -DEPC (Figura 16 B). Estos registros muestran que las diferentes concentraciones de Na^+ no generaron corrientes entrantes inclusive a 100 mM. Este resultado indica que las corrientes generadas por los ovocitos que expresaron a OsHKT2;3 perfundidos con las diferentes soluciones de Na^+ son debidas a la expresión de OsHKT2;3 y no por canales y/o transportadores endógenos del ovocito.

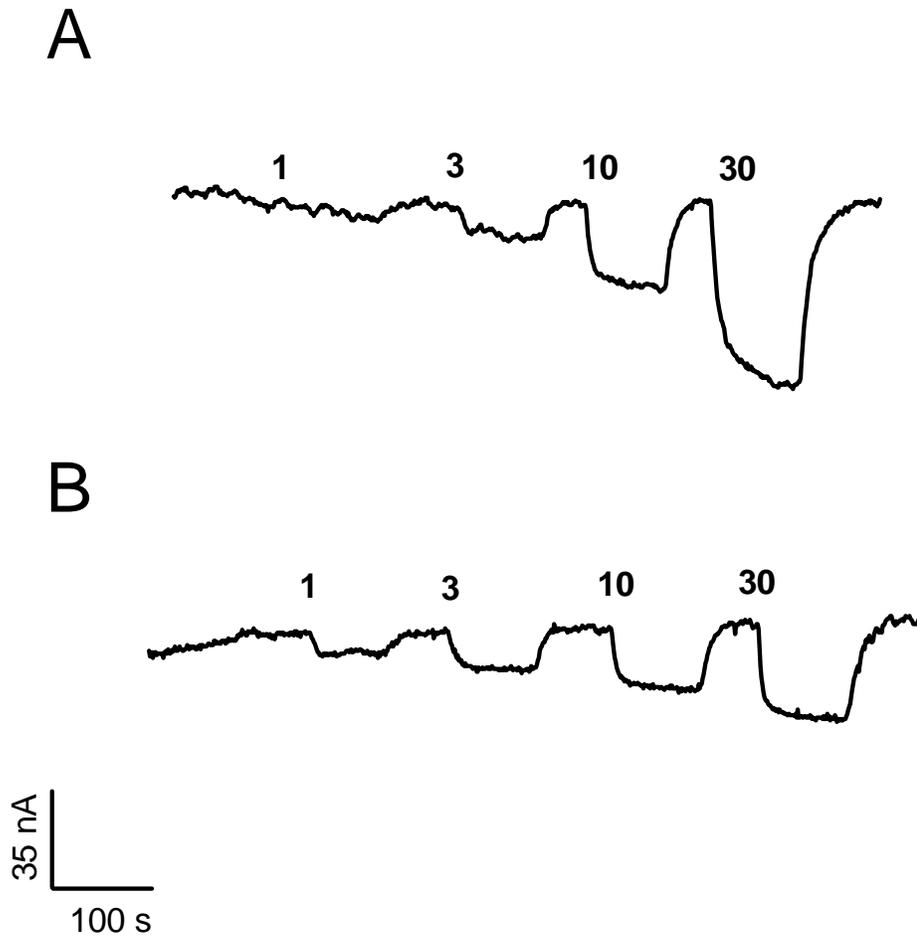


Figura 15. OshKT2;3 transporta K⁺. (A) Registro de las corrientes de un ovocito inyectado con OshKT2;3 perfundido con diferentes concentraciones de K⁺ (los números posicionados arriba de los registros indican las concentraciones usadas en mM). (B) Al perfundir las diferentes concentraciones de K⁺ sobre ovocitos inyectados con H₂O-DEPC se generaron corrientes de menor magnitud comparadas con las corrientes registradas en ovocitos inyectados con OshKT2;3. El potencial al cual se fijaron los ovocitos inyectados con OshKT2;3 y los inyectados con H₂O-DEPC fue de -70 y -125 mV, respectivamente. (n=2) de 2 diferentes ranas.

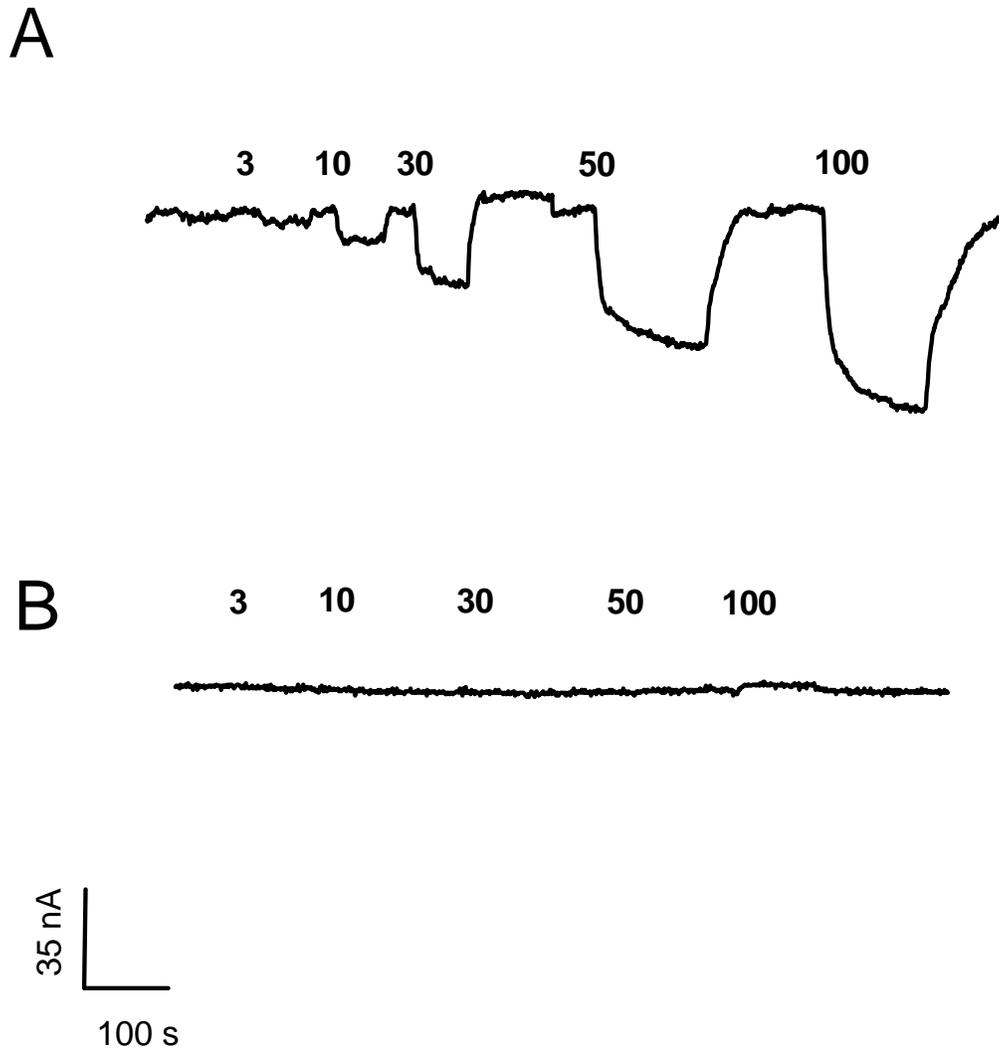


Figura 16. OsHKT2;3 transporta Na⁺. **A)** Ovocitos inyectados con OsHKT2;3 y perfundidos con diferentes concentraciones mM de Na⁺ (representadas con los números posicionados arriba de los registros). **B)** En ovocitos inyectados con H₂O-DEPC no se observó la activación de corrientes negativas a ninguna concentración de Na⁺. El potencial al cual se fijaron los ovocitos inyectados con OsHKT2;3 y los inyectados con H₂O-DEPC fue de -70 y -125 mV, respectivamente. (n=5) de dos diferentes ranas.

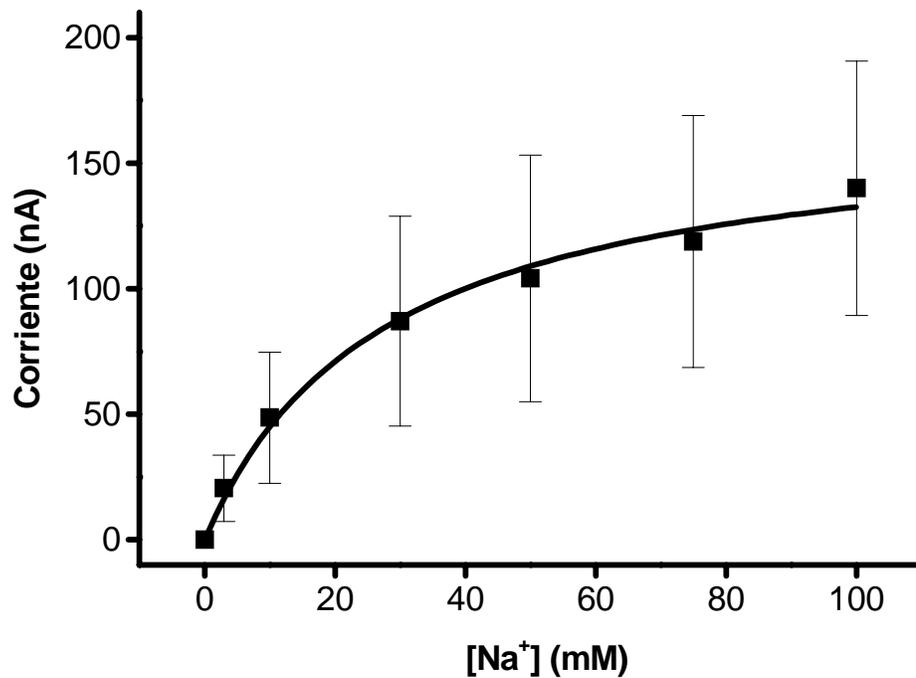


Figura 17. OsHKT2;3 tiene una baja afinidad hacia Na⁺. Las corrientes generadas por las distintas concentraciones de Na⁺ se graficaron y se ajustaron a una cinética de tipo Michaelis-Menten. De este ajuste se calculó una K_m de 27 ± 5 mM y una V_{max} de 169 ± 10 nA. Los datos son la media \pm DS ($n=5$) de 3 diferentes ranas.

Con la finalidad de obtener mayor información sobre las propiedades de este transportador, se realizaron experimentos para determinar la afinidad de OsHKT2;3 por Na^+ . La figura 17 muestra los valores obtenidos de las corrientes que se generaron al fluir las diferentes concentraciones de Na^+ en ovocitos inyectados con el ARN de OsHKT2;3. A estos datos se les pudo hacer un ajuste de tipo Michaelis-Menten, lo cual permitió calcular una $K_m = 27 \pm 5$ mM y una $V_{\max} = 169 \pm 10$ nA para Na^+ . Este valor de K_m clasifica a OsHKT2;3 como un transportador de baja afinidad a Na^+ .

Los registros anteriores muestran que OsHKT2;3 transporta tanto a Na^+ como a K^+ , registrando corrientes de -28 y -64 nA con 30 mM de Na^+ y K^+ , respectivamente. Esto supone que OsHKT2;3 posee una mayor permeabilidad hacia K^+ que a Na^+ (comparar figuras 15 A y 16 A), sin embargo, en ovocitos control solo las diferentes soluciones de K^+ (Figura 15 B), y no las de Na^+ (Figura 16 B) generan corrientes entrantes (vease figura 7). Estos resultados nos sugieren que probablemente los niveles de la corriente de casi el doble con 30 mM de K^+ con respecto a lo registrado con la misma concentración de Na^+ en ovocitos inyectados con el ARN de OsHKT2;3 se deba a la sumatoria de la corriente endógena de los ovocitos generada por K^+ y la corriente que genera la presencia de OsHKT2;3 y no porque OsHKT2;3 sea más permeable a K^+ que a Na^+ . Lo que supone que OsHKT2;3 transporte indistintamente tanto Na^+ como K^+ . Con el objetivo de tener más información acerca de las propiedades de transporte de OsHKT2;3 se realizaron experimentos para determinar la selectividad de OsHKT2;3 hacia los cationes alcalinos. La figura 18 A muestra un registro original obtenido en un ovocito que expresó a OsHKT2;3 y al que se expuso a los diferentes cationes alcalinos a una concentración de 30 mM. Como se puede observar, cada uno de los cationes alcalinos generó una corriente entrante. El Cs^+ , K^+ y Rb^+ generaron corrientes de magnitud similar (aproximadamente de -200 nA), sin embargo, Li^+ y Na^+ generaron corrientes similares pero de menor magnitud de aproximadamente -150 nA.

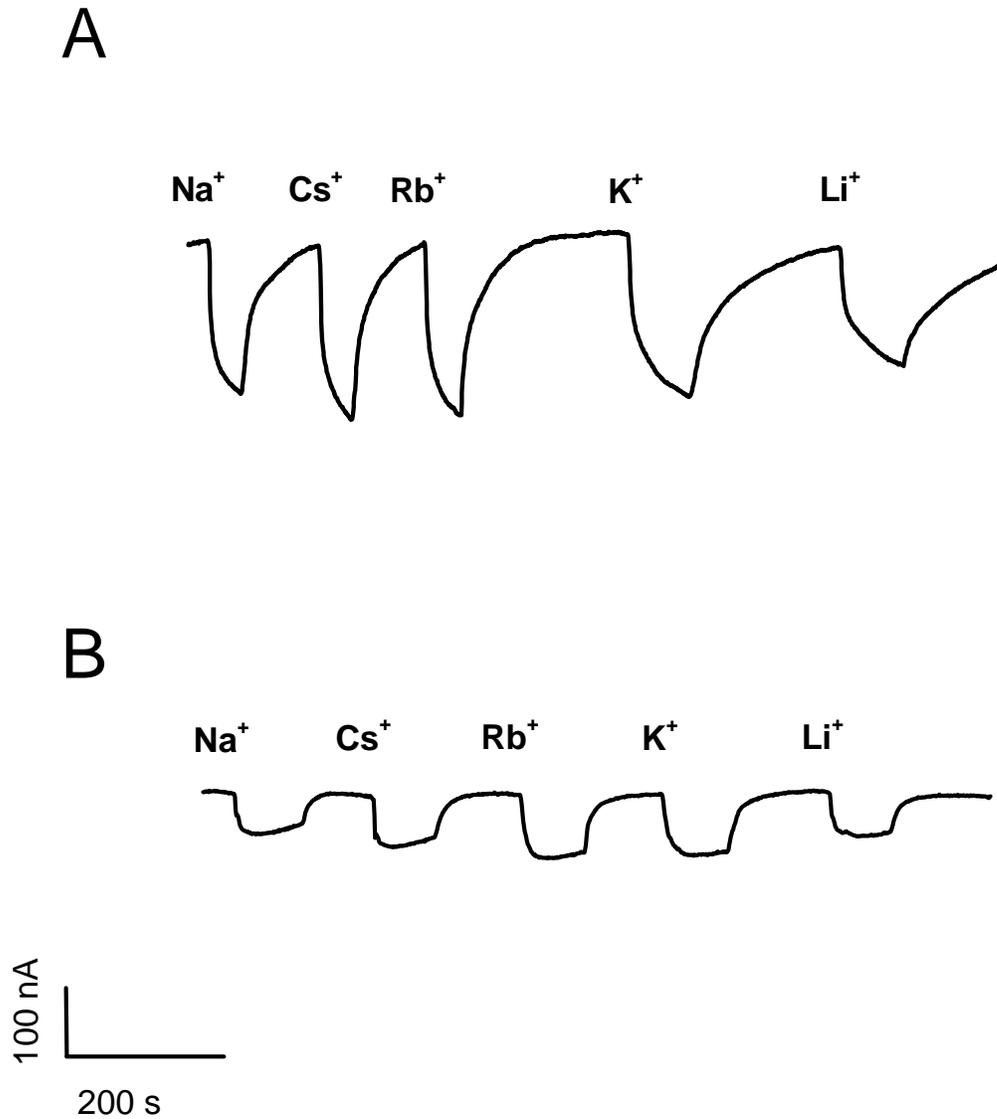


Figura 18. OshKT2;3 transporta a todos los cationes alcalinos. (A) Registro original de un ovocito inyectado con ARN de OshKT2;3 perfundidos con los diferentes cationes alcalinos. **(B)** Ovocito control (H_2O -DEPC) perfundido con las mismas soluciones que en **(A)**. En estos experimentos se usaron cloruros de los diferentes cationes alcalinos. El potencial de mantenimiento fue de -117 y -122 mV para ovocitos inyectados con OshKT2;3 y control, respectivamente. Muestra representativa de una $n=3$ de 3 diferentes ranas. Se usaron cloruros de los diferentes cationes alcalinos.

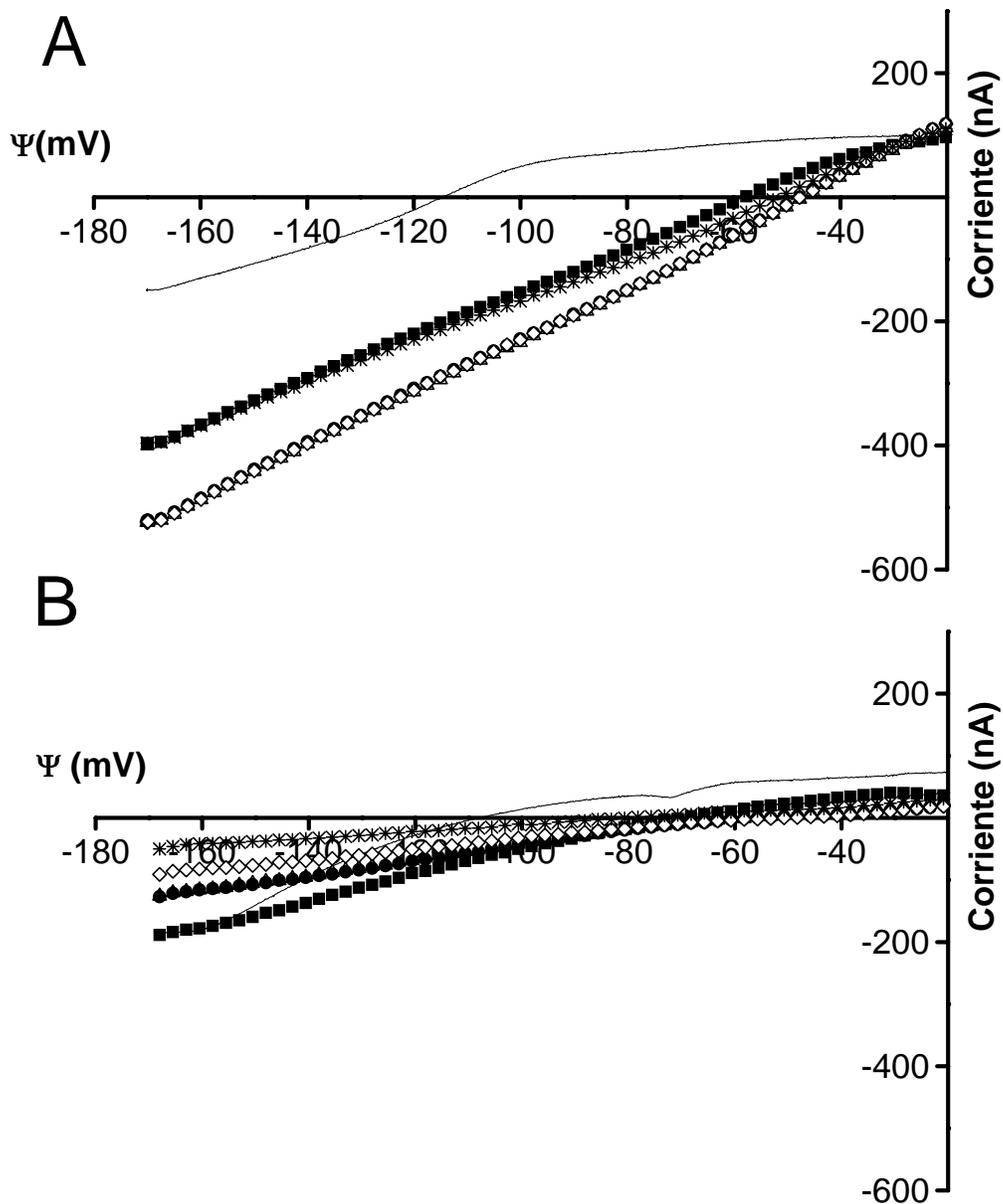


Figura 19. OshKT2;3 no discrimina entre los diferentes cationes alcalinos. A) Curvas corriente-voltaje obtenidas de ovocitos inyectados con OshKT2;3 en presencia de los diferentes cationes alcalinos. **B)** Corrientes registradas en ovocitos control inyectados con H₂O-DEPC perfundidos con las mismas soluciones que en **A)**. Los potenciales de mantenimiento fueron de -117 y -121 mV en ovocitos que expresaron a OshKT2;3 y los inyectados con H₂O-DEPC, respectivamente. Los símbolos -, ■, △, ●, ◇ y * representan a soluciones sin ningún cation, Na⁺, Cs⁺, Rb⁺, K⁺ y Li⁺, respectivamente. Muestra representativa de una n=5 tanto en **A** como en **B**.

Para descartar la posibilidad de que estas corrientes fueran generadas por canales y/o transportadores endógenos del ovocito se fluyeron las mismas concentraciones de los diferentes cationes alcalinos sobre ovocitos inyectados con H₂O-DEPC (Figura 18 B). Las soluciones con los diferentes cationes alcalinos generaron corrientes entrantes, sin embargo, es notorio que la magnitud de las corrientes fue mucho menor a aquella registradas en ovocitos que expresaron a OshKT2;3 perfundidos con los mismos cationes alcalinos. Estos resultados sugieren que OshKT2;3 es un transportador no selectivo de cationes alcalinos.

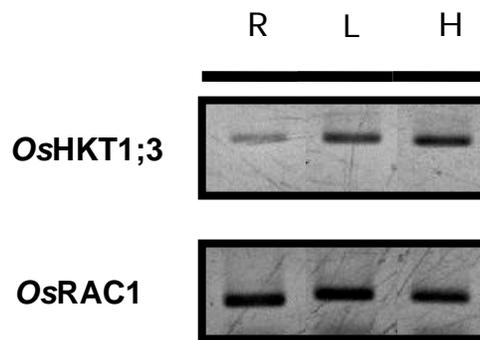
Para confirmar lo anterior, se determinó la selectividad cationica de OshKT2;3 mediante la obtención de E_r en presencia de los diferentes cationes alcalinos. Al fluir las soluciones de los diferentes cationes alcalinos sobre un ovocito que expreso a OshKT2;3 se observó en los registros un cambio en el potencial de inversión muy similar para todos los cationes alcalinos (Figura 19 A). El desplazamiento del potencial de inversión tomando como referencia al E_r de la solución 00 (-) fue mayor para K⁺, Rb⁺ y Cs⁺ (-68 mV), siendo menor para Li⁺ (-63 mV) y para Na⁺ (-58 mV; Figura 19 A). Por otro lado, y como se demostró anteriormente (Figura 18) las corrientes generadas por los diferentes cationes alcalinos también fueron mayores para K⁺, Rb⁺ y Cs⁺, disminuyendo para Li⁺ y Na⁺ (Figura 19). Como control, se realizó el mismo tipo de experimentos con ovocitos inyectados con H₂O-DEPC observándose un desplazamiento del E_r muy similar entre Cs⁺, Rb⁺, K⁺ y Li⁺ (-38 mV) ya que Na⁺ genero un desplazamiento del E_r menor (-25 mV; Figura 19 B), no obstante, los desplazamientos del E_r son mayores para los ovocitos que expresaron a OshKT2;3 que para los registrados en ovocitos control (comparar figuras 19A y 19B). También es de notar que la magnitud de las corrientes generadas por los diferentes cationes alcalinos fueron menores en ovocitos inyectados con H₂O-DEPC con respecto a las generadas en ovocitos que expresaron a OshKT2;3 donde alcanzaron un nivel aproximado de -500 nA. Estos resultados ayudan a confirmar que OshKT2;3 es un transportador no selectivo de cationes alcalinos.

4.3 ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* A NIVEL DE TRANSCRITO

El análisis de la expresión de los ARN mensajeros que codifican para los transportadores *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* se realizó con el objetivo de obtener información sobre los sitios de expresión de estos genes que en combinación con la caracterización de sus propiedades de transporte nos permita tener una idea de su posible papel fisiológico en el arroz. La cuantificación de los niveles de transcrito se realizó mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativo usando al gen de la actina (*OsRAC1*) como control de carga.

La expresión del transcrito del gen *OsHKT1;3* se localizó en las raíces, en la hoja (H) y en la cobertura (L) de esta (Figura 20A). La cuantificación de la expresión del transcrito reveló que su expresión fue menor en las raíces que en la parte aérea, siendo su expresión similar en L y en H (Figura 20B). Con el objetivo de conocer si la expresión del transcrito se veía afectada por el estrés salino (30 mM NaCl) o por la deficiencia de K^+ , las plantas de arroz fueron expuestas a estos estreses por 40 y 24 h, respectivamente. Los análisis de RT-PCR de plantas en deficiencia de K^+ ($-K^+$) demostraron que los niveles del transcrito de *OsHKT1;3* no fueron afectados en ninguno de los tres tejidos (Figura 20 B). Cuando a las plantas se les sometió al estrés salino (Na^+) la abundancia del transcrito no se modificó ni en las raíces, ni en la parte aérea. Estos resultados indican que aparentemente la expresión del gen de *OsHKT1;3* no es afectada por la imposición del estrés salino y la deficiencia de K^+ (Figura 20B). Por otra parte, la expresión de *OsHKT2;3* se localizó en L y en H, sin embargo, la expresión del transcrito no se detectó en la raíz (Figura 21 A). También se observó que los niveles del transcrito de *OsHKT2;3* son menores en L que en H (Figura 21B). Al colocar las plantas a un déficit de K^+ se observó que los niveles del transcrito no cambiaron en la parte aérea (L y H). De manera similar la presencia de 30 mM de NaCl en el medio nutritivo no causó una modificación en los niveles de abundancia de *OsHKT2;3*. Bajo ninguna de las condiciones de estrés impuestas se observó la inducción de *OsHKT2;3* en la raíz (Figura 21 B).

A



B

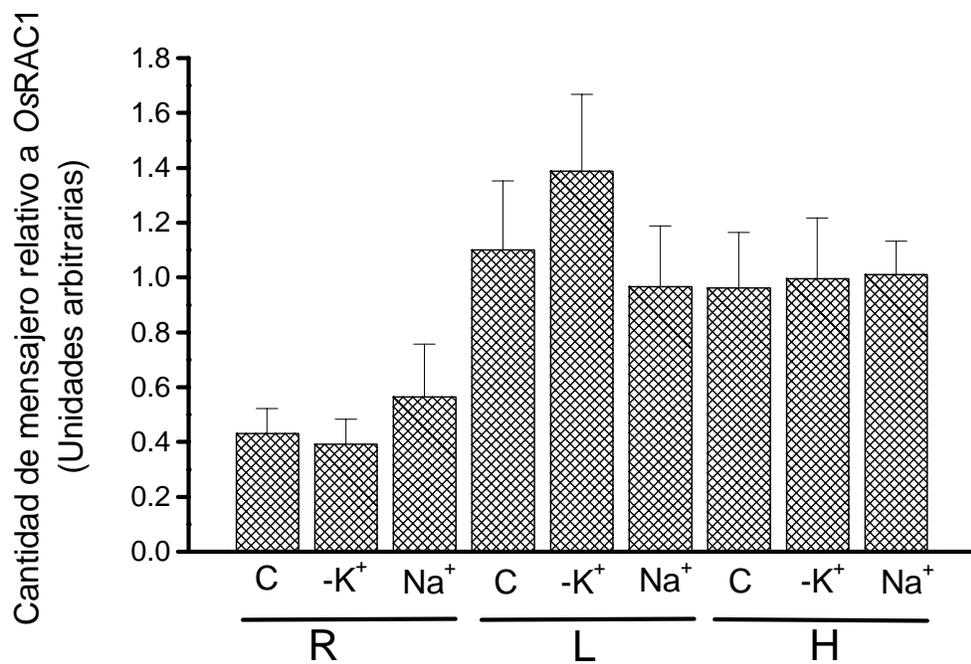


Figura 20. Sitios de expresión del ARNm de *OsHKT1;3* y su regulación por la deficiencia de K⁺, y por estrés salino. A) *OsHKT1;3* se expresa en raíz (R), cobertura de la hoja (L) y en la hoja (H). B) Cantidad del transcrito en ausencia de K⁺ (-K⁺), presencia de 30 mM de NaCl (Na⁺) y condiciones control (C). Los datos son la media ± DS de cinco repeticiones.

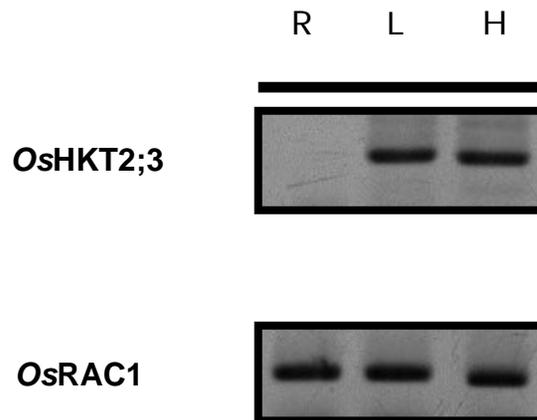
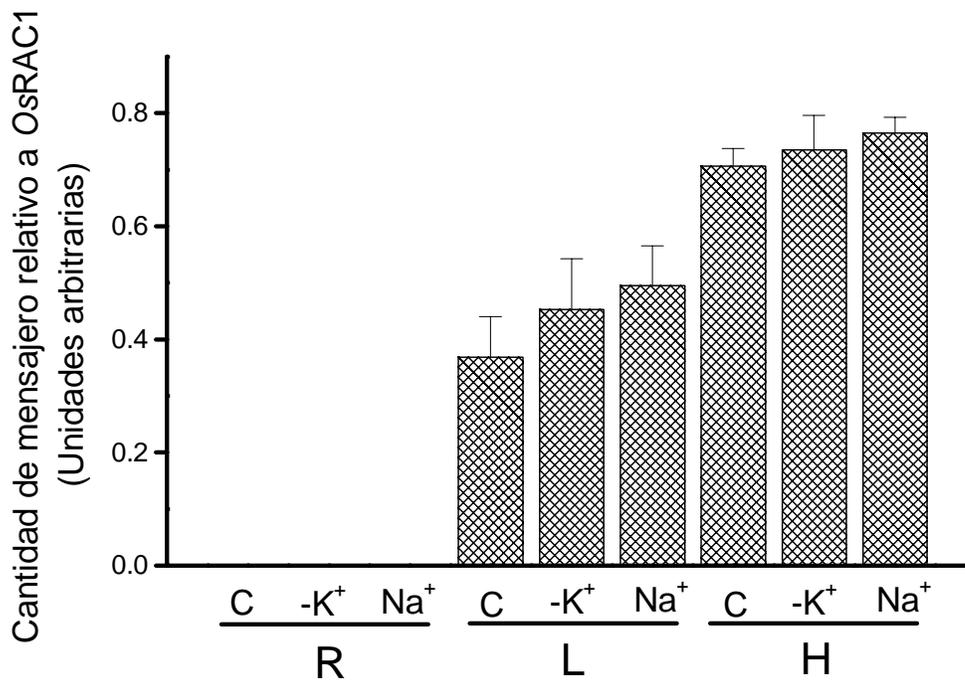
A**B**

Figura 21. Sitios de expresión de *OsHKT2;3* y su regulación por la imposición de estrés salino y la ausencia de K⁺. A) *OsHKT2;3* se expresa en la cobertura de la hoja (L) y en la hoja (H) pero no en la raíz (R). **B)** Cantidad del transcrito en presencia de 30 mM NaCl (Na⁺), la ausencia de K⁺ (-K⁺) y condiciones control (C). Los datos son la media ± DS de cinco repeticiones.

Los productos de PCR obtenidos con los oligos diseñados para amplificar tanto a *OsHKT1;3* como a *OsHKT2;3* se clonaron y se secuenciaron, lo cual corroboró que estos productos de PCR correspondieron a los fragmentos esperados de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3*.

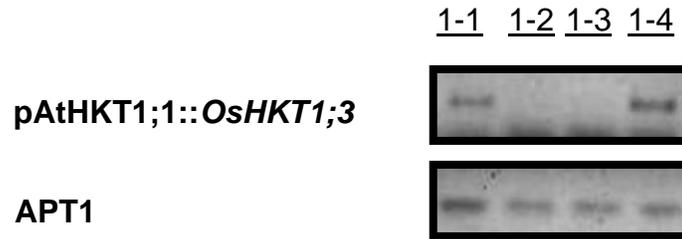
4.4 OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGENICAS DE *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* EN LA MUTANTE DE *A. thaliana Athkt1;1*

En la literatura existen dudas acerca de los sistemas de expresión heterólogos para la determinación de las propiedades de transporte de canales y/o transportadores en plantas. El caso particular de *AtHKT1;1* para quien se han identificado diferentes propiedades cuando se expresa en la mutante de *E. coli* ($\Delta Trk\Delta Kup\Delta Kdp$), en la mutante de *S. cerevisiae* a la cual se le ha eliminado los mecanismos de transporte de alta afinidad para K^+ ($\Delta trk1\Delta trk2$), o en los ovocitos de *X. laevis*. Cuando *AtHKT1;1* fue expresado en los dos primeros sistemas, sólo la expresión de *E. coli* confirió la capacidad de crecer a las bacterias a concentraciones μM de K^+ , pero no en *S. cerevisiae* donde los resultados fueron mas acordes con un mecanismo de transporte de Na^+ (Uozumi *et al.*, 2000). Por otro lado la expresión heteróloga en los ovocitos también demostró que *AtHKT1;1* corresponde a un mecanismo de transporte de Na^+ (Uozumi *et al.*, 2000). La falta de similitud entre los resultados obtenidos en los distintos sistemas heterólogos como el aquí descrito para *AtHKT1;1* crea incertidumbre sobre las propiedades reales de los mecanismos de transporte, y con ello, dificulta la interpretación de la función de estos transportadores *in planta*. Con el objetivo de obtener mas evidencias que apoyarán los resultados obtenidos en los ovocitos de *X. laevis* se transformaron plantas mutantes *Athkt1;1* con los marcos de lectura abiertos de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* bajo el control del promotor del gen de *AtHKT1;1* ($pAtHKT1;1::OsHKT1;3$ y $pAtHKT1;1::OsHKT2;3$) para asegurar la expresión de los *OsHKT* en donde *AtHKT1;1* se expresa normalmente. La mutante *Athkt1;1* es mas sensible a la salinidad que la tipo silvestre y se ha corroborado que cuando la mutante se transforma con el marco de lectura abierto de *AtHKT1;1* dirigido bajo su propio promotor, el fenotipo de estas plantas transgénicas es muy parecido al

del tipo silvestre en condiciones de salinidad (Gong *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que los transportadores OsHKT que correspondan a mecanismos de transporte de Na⁺ como lo es *AtHKT1;1*, podrán restaurar el fenotipo silvestre en la mutante *AtHkt1;1* bajo condiciones de salinidad.

Empleando al antibiótico higromicina como medio de selección, se identificaron aquellas plantas a las cuales se les insertó el T-DNA que contenía las construcciones con los marcos de lectura abiertos de *OsHKT1;3* u *OsHKT2;3*. Posteriormente se obtuvo la segunda generación con la que se pudieron determinar las líneas homocigas de cada planta transgénica correspondiente a *OsHKT1;3* o *OsHKT2;3*. A estas líneas homocigas se les analizó con la técnica de RT-PCR para corroborar que el DNA de los transportadores *OsHKT1;3* o *OsHKT2;3* se expresa en ellas, y como se muestra en la figura 22, se han obtenido varias líneas que expresan cada uno de estos genes. Estas líneas podrán ser usadas para la determinación de las propiedades de transporte mediante la observación del fenotipo en condiciones de crecimiento apropiadas.

A



B

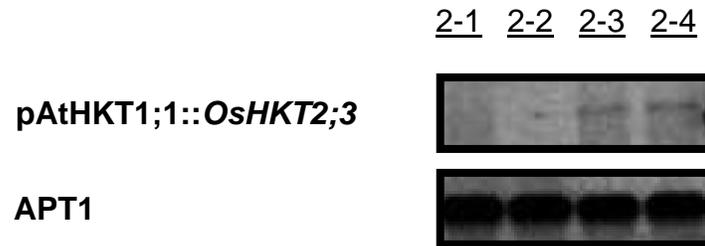


Figura 22. Expresión de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* en diferentes líneas de plantas transgénicas en el fondo mutante *Athkt1;1*. A) Expresión del ARNm de *OsHKT1;3* en dos plantas transgénicas (1-1 y 1-4) y su ausencia en otras dos (1-2 y 1-3). **B)** la expresión de transcrito de *OsHKT2;3* se detectó en las plantas transgénicas 2-3 y 2-4 pero no en 2-1 ni en 2-2. Se uso al gen APT1 (adenina fosforribosil transferasa) como control de carga.

5 DISCUSIÓN

Para poder identificar la posible función fisiológica de OsHKT1;3 y OsHKT2;3 en el arroz, se han caracterizado sus propiedades de transporte empleando su expresión heteróloga en ovocitos de la rana *X. laevis*, en combinación con estudios de la expresión de su transcrito en diferentes órganos de la planta y su regulación en respuesta a la deficiencia de K^+ y a 30 mM de NaCl. OsHKT1;3 mostró una baja afinidad por Na^+ de acuerdo a la clasificación propuesta por Epstein y col (1962), como lo indica el valor de su K_m de 3.8 ± 0.4 mM para el Na^+ (Figura 8). Esta característica es importante, ya que nos indica en que intervalos de concentraciones de Na^+ OsHKT1;3 es funcional. También se obtuvieron datos adicionales que muestran la alta selectividad de OsHKT1;3 por Na^+ . Realizando rampas de voltaje se pudo observar un desplazamiento hacia voltajes mas positivos del E_r conforme se fue incrementando la concentración extracelular de Na^+ . Este desplazamiento fue de 31-50 mV (Figuras 9 y 10) por cada diez veces el incremento de concentraciones de Na^+ , valor muy cercano al teórico predicho por la ecuación de Nernst, lo cual indica que OsHKT1;3 es altamente selectivo a Na^+ . Al comparar estos resultados con lo reportado para otros transportadores notamos que *AtHKT1;1* y OsHKT1;5, que se han descritos como transportadores de Na^+ (Uozumi *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2005), mostraron un ΔE_r de ~50 mV al cambiar las concentraciones de 1 a 10 mM de Na^+ y de ~22.5 mV en el intervalo de concentraciones de 0.3 a 3 mM de Na^+ , respectivamente, valores similares a los que registramos con OsHKT1;3 bajo las mismas concentraciones de Na^+ . Nuestros resultados confirman que los miembros de la subfamilia 1 de los transportadores HKT funcionan como mecanismos de transporte de Na^+ (Platten *et al.*, 2006).

En contraste con lo observado para el transportador OsHKT1;3, el transportador OsHKT2;3 no es tan selectivo, ya que además de llevar a cabo el transporte de Na^+ , también puede transportar K^+ , aunque las corrientes originadas por estos cationes son de menor magnitud comparadas a aquellas generadas por la actividad de OsHKT1;3. Se intento obtener una K_m para Na^+ en OsHKT2;3 pero

los valores calculados resultaron muy dispersos, obteniéndose valores desde 16 mM hasta 60 mM. No obstante estos datos muestran que la afinidad de OsHKT2;3 por Na⁺ se encuentra en niveles milimolares, clasificándolo como transportador de baja afinidad, siendo esta afinidad aún menor que la registrada para OsHKT1;3. Es importante remarcar que a diferencia de otros miembros de la subfamilia 2 (TaHKT2;1 y OsHKT2;2) OsHKT2;3 no funciona como un co-transportador Na⁺-K⁺ (Figuras 15, 16 y 17).

De acuerdo al análisis de las curvas I-V en los ovocitos que expresaron al transportador OsHKT1;3 (Figura 9) pudimos obtener la conductancia para cada concentración (1, 3, 10 y 30 mM) extracelular de Na⁺ (Figura 12). Este resultado reveló que no importa la cantidad de corriente que se genere por la concentración de Na⁺ presente en el medio extracelular, la conductancia generada será siempre la misma (Figura 12). Si bien la figura 8 muestra que a 30 mM de Na⁺ existe una saturación de la corriente iónica, ésta corriente no encuentra una mayor resistencia al pasar a través de OsHKT1;3 que la corriente generada con 1 mM de Na⁺. Estos datos aplicados en la fisiología de las plantas revelan que si, la conductancia a 1 mM es igual que a 30 mM de Na⁺, debe entonces existir una regulación del transportador para controlar el flujo de Na⁺ por medio de OsHKT1;3.

Con el objetivo de conocer más sobre las propiedades de estos transportadores, se investigó la selectividad hacia los diferentes cationes alcalinos en ambas proteínas, observándose que OsHKT1;3 transporta con menor eficiencia al resto de los cationes alcalinos lo que confirmó la alta selectividad de este transportador por Na⁺ (Figura 14A). De estos resultados se pudo derivar la siguiente secuencia de permeabilidades Na⁺>>Cs⁺>K⁺>Rb⁺>Li⁺. Corroborando los datos obtenidos anteriormente, solo en presencia de Na⁺ se pudo registrar un cambio claro en E_r, demostrando la alta selectividad de OsHKT1;3 por Na⁺ sobre el resto de los cationes alcalinos. Los dos transportadores de Na⁺ OsHKT1;5 y AtHKT1;1 muestran una permeabilidad a los cationes alcalinos similar entre ellos, con la siguiente secuencia de permeabilidades Na⁺>>K⁺>Rb⁺>Li⁺>Cs⁺ (Uozumi *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2005). Es notable que la secuencia de permeabilidades es diferente a la observada con OsHKT1;3, donde el Cs⁺ fue el segundo catión más

permeable, mientras que en los transportadores OsHKT1;5 y AtHKT1;1 fue el último. Esta observación indica la posibilidad de que el poro de OsHKT1;3 sea diferente al de los transportadores de Na⁺ OsHKT1;5 en arroz y AtHKT1;1 de *A. thaliana*. Con respecto a OsHKT2;3 observamos que este transportador no mostró una preferencia por alguno de los cationes alcalinos, similar a lo reportado para McHKT1;1 que se ha clasificado como un transportador de cationes alcalinos en general (Su *et al.*, 2003). Al comparar la secuencia de permeabilidades de OsHKT2;3, Cs⁺=Rb⁺=K>Li⁺>Na⁺ con la reportada para McHKT1;1 Rb⁺>Cs⁺>K⁺=Na⁺=Li⁺ (Su *et al.*, 2003) se observa que OsHKT2;3 tiene preferencia por los cationes monovalentes de mayor radio iónico. Esto implica la posibilidad de que la boca del transportador sea pequeña, ya que la esfera de hidratación es menor para los iones de mayor radio iónico, sin embargo el vestíbulo del transportador, donde existe una interacción directa del ion con los aminoácidos que forman el poro (Doyle *et al.*, 1998), se esperaría que fuera más grande.

En conjunto, las secuencias de permeabilidad que muestran los diferentes transportadores HKT nos proveen de posibles ideas acerca de la estructura del poro de estas proteínas de transporte. Primero, OsHKT2;3 al poseer una preferencia por los cationes de mayor radio iónico como lo son el Cs⁺, Rb⁺ y K⁺ indica que posiblemente existen diferencias en el tamaño del poro entre OsHKT2;3 y OsHKT1;3, ya que este último es altamente selectivo a Na⁺ y poco permeable al resto de los cationes alcalinos. La propuesta de que existe una diferencia en la estructura del poro de los diferentes transportadores HKT se apoya también por la esfera de solvatación de cada uno de los diferentes cationes alcalinos, siendo Li>Na>K≈Rb≈Cs (radios de hidratación= 3.4, 2.76, 2.32, 2.28 y 2.28 Å, respectivamente) lo cual indica que el vestíbulo del poro también es distinto en tamaño para cada uno de los transportadores HKT. Los cuestionamientos que surgen al observar estas diferencias entre las propiedades de OsHKT1;3 y OsHKT2;3 son muchas, pero que se podrían englobar en una sola pregunta: ¿Qué es lo que determina estas diferencias en el transporte en la familia de los HKT?

Se ha propuesto que la selectividad de los transportadores HKT reside principalmente en la presencia de una Gly o una Ser en el segmento P_A (Figura 6)

de la proteína, confiriendo una selectividad hacia K^+ o hacia Na^+ , respectivamente (Mäser *et al.*, 2002). Sin embargo, como nuestros resultados muestran, así como los reportados para otros transportadores HKT, esta observación no es completamente correcta (Fairbain *et al.*, 2000; Horie *et al.*, 2001). El caso particular de OsHKT2;3 es un ejemplo. Este transportador presenta una Gly en el segmento P_A que de acuerdo a lo propuesto por Mäser *et al.* (2002) debería de funcionar como un transportador selectivo a K^+ y/o como un co-transportador Na^+-K^+ , sin embargo nuestros resultados muestran que OsHKT2;3 no posee una selectividad específica entre los cationes alcalinos (Figura 19). Por otro lado, la ausencia de selectividad iónica en OsHKT2;3 es similar a lo reportado para McHKT1;1, miembro de la subfamilia 1, que al presentar una Ser en el P_A se esperaría que funcionara como un mecanismo de transporte altamente selectivo a Na^+ , discrepando con el mecanismo propuesto por Mäser *et al.* (2002). Otra discrepancia con el modelo de Mäser *et al.* (2002) son los transportadores EcHKT1;2 y EcHKT1;1 (Fairbain *et al.*, 2000), que al igual que McHKT1;1 y OsHKT1;3, pertenecen a la subfamilia 1 (Platten *et al.*, 2006), pero funcionan como co-transportadores Na^+-K^+ (Fairbain *et al.*, 2000), indicando que las propiedades de transporte de los miembros de la familia HKT no dependen exclusivamente de la presencia de una Gly o Ser en el segmento P_A de la proteína. Esta conclusión se ve reforzada por las evidencias que muestran que otros sitios fuera del P_A participan en la selectividad hacia Na^+ como son los aminoácidos N365, F463 y E464 en TaHKT2;1 (Diatloff *et al.*, 1998; Rubio *et al.*, 1999). Diatloff *et al.* (1998) demostraron que los aminoácidos F463 y E464 son importantes para la unión y transporte de Na^+ por este transportador en levaduras. No obstante falta comparar si estos sitios tienen la misma importancia en otros transportadores HKT, sobre todo aquellos que son transportadores selectivos a Na^+ . Por otra parte, se tiene evidencia que el aminoácido K1147 posicionado en el $M2_D$ (Figura 1C) en los TRK de levadura, que son ortólogos a los HKT de plantas, tiene una participación importante en la selectividad hacia K^+ (Haro *et al.*, 2003). Este aminoácido K1147, está conservado en la familia de los HKT, lo que podría sugerir una participación en la selectividad hacia K^+ en combinación con otros

aminoácidos en las proteínas HKT. Actualmente, no es claro cuales son los aminoácidos responsables en la selectividad a K^+ y de aquellos aminoácidos que confieren sus propiedades de transporte al resto de los HKT, y sobre todo, si la estructura del poro de los transportadores HKT es la misma entre todos sus miembros. Estos son algunos aspectos que deben de investigarse para ampliar nuestro conocimiento sobre el funcionamiento de estos mecanismos de transporte y poder asignarles un papel fisiológico.

La caracterización electrofisiológica de los transportadores *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* es un paso inicial en la búsqueda de la función de los transportadores HKT en el arroz, ya que necesariamente se requiere de mayor información referente, por ejemplo, a su expresión tanto a nivel de transcrito como a nivel de proteína, además de si existe algún tipo de regulación en el mensajero o la proteína en respuesta a algún tipo de estrés. Debido a esto realizamos los estudios de expresión génica en *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3*.

Los análisis de la expresión de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* a nivel de transcrito revelaron dos cosas importantes. Primero, que estos transportadores se expresan en la cobertura de la hoja y en la hoja. En las raíces, sólo se expresó *OsHKT1;3*, pero a un menor nivel que en las hojas y en la cobertura de estas. *OsHKT2;3* no pudo ser amplificado de la raíz. Segundo, que la abundancia del transcrito no cambia en la presencia de Na^+ o la ausencia de K^+ . Es importante mencionar que nuestros estudios se realizaron en la variedad Pokkali que es una variedad tolerante a la salinidad, mientras que otros trabajos en el arroz han empleado variedades sensibles a la salinidad, como lo es la variedad Nipponbare (Garcia-deblás *et al.*, 2003).

Nuestros análisis a nivel de transcrito muestran que los niveles de expresión de los transportadores *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* fueron mayores en Pokkali comparado con lo reportado en Nipponbare, ya que observamos que la expresión de ambos genes fue muy similar a la de *OsRAC1* en la parte aérea mientras que en Nipponbare, Garcia-deblás *et al.* (2003) reportaron que la expresión de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* fue menor por uno o dos ordenes de magnitud con respecto a *OsRAC1*. En las raíces, nuestros resultados muestran

una similitud con lo reportado por Garcíadeblás y col (2003), ya que la abundancia de *OsHKT1;3* es tres veces menor de lo que se expresa en la parte aérea y para *OsHKT2;3* no se pudo detectar el transcrito. Sin embargo, otros transportadores HKT del arroz son abundantes en las raíces y se inducen por estrés salino, como es el caso de *OsHKT1;5* en la línea Nona Bokra, que es una variedad tolerante a la salinidad (Ren *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que el incremento en la abundancia de los transportadores HKT en variedades tolerantes a la salinidad en arroz podría estar contribuyendo de manera importante al uso y manejo adecuado de Na^+ (Ren *et al.*, 2005).

Con los resultados obtenidos sobre la expresión génica y sobre las propiedades de transporte de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* podemos proponer un posible papel de estos transportadores en el arroz. *OsHKT1;3* se expresa en los tejidos de la cobertura de la hoja, la hoja y las raíces. Siendo un transportador de Na^+ , en la parte aérea *OsHKT1;3* podría estar participando en el transporte de Na^+ hacia el floema para disminuir su concentración en el tejido fotosintético y recircularlo hacia las raíces donde podría ser expulsado por la actividad de un antiportador Na^+/H^+ tipo SOS1 (Shi *et al.*, 2000). También existen reportes que muestran que el Na^+ se acumula en la cobertura de la hoja (Huang *et al.*, 2006), lo cual pudiera sugerir que *OsHKT1;3* pueda estar dirigiendo al Na^+ hacia este tejido. Como se menciona anteriormente *OsHKT1;3* también se ha localizado en las raíces, donde podría participar en la remoción del Na^+ del xilema, previniendo su transporte a las partes aéreas de la planta, como se ha sugerido para *AtHKT1;1* y *OsHKT1;5* (Davenport *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2005). Con base a sus propiedades de transporte, se propone que el papel de *OsHKT1;5* y *AtHKT1;1* es evitar que el Na^+ se transporte a la parte aérea, mediante su exclusión del xilema por las células del parénquima del xilema. Por otra parte, *OsHKT1;3* también podría participar en la absorción de Na^+ . La K_m de este transportador hacia Na^+ es de 3.7 mM y por lo general, las concentraciones de Na^+ en el suelo pueden variar de 2 a 300 mM (Tester y Davenport. 2003), lo que indica que *OsHKT1;3* sí podría participar en la absorción de Na^+ ya que como se observa en los análisis de la abundancia del transcrito *OsHKT1;3* se expresa en las raíces. Apoyando esta

propuesta, existen datos que muestran que la absorción del Na^+ no es del todo perjudicial para las plantas, siempre y cuando la concentración extracelular no exceda niveles de aproximadamente 5 mM y exista una deficiencia de K^+ (Marschner. 1988). Recientemente se ha demostrado que *OsHKT2;1* es uno de los mecanismos que contribuye de manera importante al desarrollo y crecimiento del arroz en condiciones de deficiencia de K^+ , absorbiendo Na^+ cuando este se encuentra presente a niveles micromolares, substituyendo así al K^+ por Na^+ y ayudando a mantener la homeostasis osmótica de las células (Horie *et al.*, 2007). Sin embargo, la actividad de este mecanismo se ve limitada ya que se regula negativamente por la presencia de K^+ y se satura a concentraciones milimolares de Na^+ (Horie *et al.*, 2007; Garcíadeblás *et al.*, 2003). *OsHKT1;3* podría ser una vía alterna o paralela por la cual el Na^+ podría ser absorbido cuando la actividad de *OsHKT2;1* se encuentre saturada por concentraciones mM de Na^+ o sea inhibida por la presencia de concentraciones micromolares de K^+ (Garcíadeblás *et al.*, 2003), y así compensar la falta de K^+ en la planta del arroz.

Las propiedades de transporte identificadas para *OsHKT2;3* muestran que a pesar de no ser selectivo a uno de los cationes alcalinos, este mecanismo tiene una ligera preferencia por los cationes de mayor radio iónico (K^+ , Rb^+ y Cs^+). Los datos que se obtuvieron del patrón de expresión a nivel de transcrito de *OsHKT2;3* muestra que solo esta presente en la parte aérea. Estos resultados en conjunto se pueden emplear para proponer que este transportador no está implicado en la absorción de Na^+ por las raíces, y que su participación fisiológica sea en la redistribución del K^+ en la parte aérea. Ahí sus funciones pueden ser variadas como el transporte de K^+ hacia el floema para crear el gradiente osmótico necesario que establece el flujo en masa requerido en el transporte de fotosintatos del floema superior al floema inferior. Alternativamente, podría estar participando en la distribución del K^+ contenido en el xilema hacia los diferentes tejidos de la parte aérea, particularmente el tejido fotosintético. Un dato interesante que podría estar apoyando la participación de *OsHKT2;3* en el transporte de K^+ es que la variedad Pokkali mantiene la proporción $\text{K}^+:\text{Na}^+$ alta en condiciones de salinidad (Kyu-Seong *et al.*, 2003), lo que sugiere que esta variedad posee diferentes

mecanismos en el transporte de K^+ que no se ven afectados por la presencia de Na^+ .

Estas propuestas en cuanto a la posible función de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* en el arroz tendrán más apoyo con estudios de la localización de la proteína, o técnicas alternas para poder corroborar la expresión del gen como podría ser el uso de plantas transgénicas que muestren el patrón de expresión del gen mediante el reportero GUS fusionado a la región promotora de los genes *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3*, así como, obtener las mutantes de estos genes y encontrar las condiciones ambientales que revelen la función de estos transportadores en el arroz.

Por otra parte, aún se desconoce qué tipo de regulación existe en estos transportadores, excepto para *OsHKT2;1* y *OsHKT1;5* donde se reporta que ambos responden a la salinidad disminuyendo e incrementando su expresión a nivel de transcrito, respectivamente. Nuestros resultados muestran que la presencia de Na^+ o la ausencia de K^+ no altera la expresión del transcrito de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* en Pokkali, lo cual indica que la regulación de estos mecanismos no es a nivel transcripcional, y que posiblemente la regulación de la actividad de estos transportadores es a nivel traduccional o post-traduccional. Este último tipo de regulación podría ser por fosforilación/desfosforilación de la proteína, del cual se sabe que es un mecanismo de regulación común para controlar la actividad de varias proteínas de transporte (Hardie 1999). Otro mecanismo podría ser la regulación por Ca^{2+} . Se sabe que este segundo mensajero regula la actividad de canales/transportadores mediante un cambio en sus concentraciones citoplásmicas (Hetherington y Brownlee 2004). Otra forma de regulación que podría estar operando entre la familia de los HKT es la hetero-oligomerización. Como se mostró en las figuras 20 y 21, los transcritos de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* están presentes en los mismo tejidos, excepto en la raíz. Se ha observado que la hetero-oligomerización entre miembros de la misma familia de transportadores o canales regula la actividad de estos como lo es en las aquaporinas, los transportadores de amonio y los transportadores de azúcares de plantas, donde la hetero-oligomerización establece una vía de regulación de la

proteína, inactivando, cambiando afinidades hacia el sustrato o regulando simplemente la actividad de la proteína (Nannette *et al.*, 2002; Neuhäuser *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2003). Es importante determinar cómo se regulan los diferentes HKT en el arroz, de tal manera que se pueda tener una visión mas completa de estos transportadores en cuanto a su participación en la fisiología de la planta, así como su contribución ante algún tipo de estrés.

Debido a las diferencias en las propiedades de transporte que se han reportado para varios HKT's cuando estos se expresan en diferentes sistemas heterólogos se decidió emplear a *A. thaliana* como un sistema de expresión heteróloga alternativo. *A. thaliana* solo posee un gen de HKT y actualmente ya se cuenta con la mutante *Athkt1;1* (Rus *et al.*, 2001; Berthomieu *et al.*, 2003). La expresión del gen de *AtHKT1;1*, mediante el gen reportero GUS, es alrededor de los haces vasculares del xilema. Esto sugirió, junto con el fenotipo de la mutante *Athkt1;1* crecida en condiciones de salinidad, que la función de *AtHKT1;1* es remover el Na⁺ del xilema para así evitar un incremento de su concentración en la parte aérea (Rus *et al.*, 2001). Por otro lado, el trabajo de Gong *et al.* (2004) mostró que al complementar la mutante *Athkt1;1* de *A. thaliana* con el transportador *AtHKT1;1*, el fenotipo de la mutante bajo condiciones de estrés salino recuperó el mostrado por las plantas tipo silvestre, es decir una menor sensibilidad al estrés por sal. Esto nos condujo a pensar que aquellos transportadores OsHKT que posean propiedades electrofisiológicas similares a las de *AtHKT1;1*, como es el caso de *OsHKT1;3*, restablecerían el fenotipo silvestre en la mutante *Athkt1;1* corroborando así los resultados obtenidos en el sistema de *X. laevis*. En el caso de las líneas transgénicas *pAtHKT1;1::OsHKT2;3* es probable observar un fenotipo que muestre una disminución en el crecimiento, ya que *OsHKT2;3* puede remover K⁺ de los haces vasculares del xilema evitando así el flujo de K⁺ hacia la parte aérea y con ello repercutiendo en el crecimiento celular. Esto sucedería en condiciones de crecimiento normales. Probablemente en condiciones de salinidad el fenotipo sea parecido al de las líneas transgénicas

pA#HKT1;1::OsHKT1;3, ya que OsHKT2;3 puede llevar a cabo también el transporte de Na⁺.

6 Conclusiones

- OsHKT1;3 y OsHKT2;3 son transportadores de Na⁺ de baja afinidad. Sin embargo OsHKT1;3 es un transportador altamente selectivo a Na⁺.
- Debido a que el transcrito de OsHKT1;3 se expresó tanto en raíz, hoja y cobertura de la hoja, este transportador pudiera participar en el transporte de Na⁺ por toda la planta del arroz. Por otra parte, OsHKT2;3 sólo se expresó en la parte aérea, limitando su contribución al flujo de Na⁺ y K⁺ en estos tejidos.
- La expresión de los transcritos de OsHKT1;3 y OsHKT2;3 no fue afectada por 30 mM de NaCl o la deficiencia de K⁺ en la variedad Pokalli, tolerante a la salinidad, lo cual sugiere que la actividad de estos transportadores no se regula transcripcionalmente bajo estos tipos de estrés.

7 Perspectivas

- Realizar el análisis de la expresión génica de los transportadores *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* a lo largo del desarrollo de la planta de arroz.
- Analizar la expresión génica de los transportadores *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* a tiempos de estrés mas largos.
- Corroborar los sitios de expresión de *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* en plantas transgénicas de arroz mediante la fusión de las regiones promotoras al gen reportero GUS.
- Localizar a nivel celular la expresión de ambos transportadores mediante la fusión de éstos a un gen reportero como la GFP.
- Analizar la función de estos transportadores en plantas de arroz mediante la generación de las mutantes *Oshkt1;3* y *Oshkt2;3*.
- Determinar posibles mecanismos de regulación post-traducciona l en los transportadores *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3* como fosforilación/defosforilación, pH, Ca²⁺, etc.
- Emplear las líneas transgénicas de *pAtHKT1;1::OsHKT1;3* y *pAtHKT1;1::OsHKT2;3* en la determinación de las propiedades de los transportadores *OsHKT1;3* y *OsHKT2;3*.

8 Bibliografía

- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R. 2000. GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Letters*. **486**: 93–98.
- Amtmann A., Fischer M., Marsh E. L., Stefanovic A., Sanders D., y Schachtman D.P. 2001. The Wheat cDNA *LCT1* Generates Hypersensitivity to Sodium in a Salt-Sensitive Yeast Strain. *Plant Physiology*. **126**:1061–1071.
- Anderson J. A., Huprikar S. S., Kochian L. V., Lucas W. J., Gaber R. F. 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*. **89**: 3736-3740.
- Balagué C., Lin B., Alcon C., Flottes G., Malmström S., Neuhaus G., Pelletier G., Gaymard F. Y Roby D. 2003. HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell*. **15**:365-379.
- Bañuelos MA, Garciadeblás B, Cubero B, Rodríguez-Navarro A. 2002. Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiology*. **130**: 784–795.
- Becker D, Geiger D, Dunkel M,. 2004. *AtTPK4*, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *PNAS*. **101**:15621–15626.
- Berneche S. & Roux B. 2001. Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature*. **414**:73-77.
- Berthomieu P., Conéjéro G., Nublat A., Brackenbury J. W., Lambert C., Savio C., Uozumi N., Oiki S., Yamada K., Cellier F., Gosti F., Thierry S., Essah P. A., Tester M., Véry A. A., Sentenac H. y Casse F. 2003. Functional analysis of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J*. **22**:2004-2014.
- Buchanan, B., Gruissem, R. J. And Russell, J. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD.

- Byrt CS, Platten JD, Spielmeyer W, James RA, Lagudah ES, Dennis ES, Tester M, Munns R. 2007. HKT1;5-like cation transporters linked to Na⁺ exclusion loci in wheat, Nax2 and Kna1. *Plant Physiol.* **143**:1918-28.
- Davenport RJ, Muñoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A, Tester M The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis. 2007. *Plant Cell Environ.* **30**:497-507.
- Diatloff E., Kumar R., Schachtman D.P. 1998. Site directed mutagenesis Reduces the Na⁺ affinity of HKT1, a Na⁺ energized high affinity K⁺ transporter. *FEBS.* **432**:31-36.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait T, MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* **280**:69-77.
- Durell SR. & Guy HR. 1999. Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K⁽⁺⁾ channel. *Biophys J.* **77**:789-807.
- Durell SR, Hao Y, Nakamura T, Bakker EP, Guy HR. 1999. Evolutionary relationship between K⁽⁺⁾ channels and symporters. *Biophys J.* **77**:775-788.
- Epstein R. y Elzam DW. 1962. Resolution of dual mechanism of potassium absorption by barley rots. *PNAS.* **49**:684-692.
- Fairbairn DJ, Liu W, Schachtman DP, Gomez-Gallego S, Day SR, Teasdale RD. 2000. Characterization of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Mol. Biol.* **43**:515-525.
- Gassmann W, Rubio F & Schroeder JI. 1996. Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J.* **10**:869-882.
- Garciadeblás B., Senn E. M., Bañuelos M. A., Rodríguez-Navarro A. 2003. Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *The Plant J.* **34**:788-801.
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, MichauxFerriere N, Thibaud JB, Sentenac H. 1998. Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell.* **94**:647–655.

- Gierth M., Maser P., Schroeder J. I. 2005. The potassium transporter *AtHAK5* functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in Arabidopsis roots. *Plant Physiology*. **137**: 1105-1114.
- Gong J. M., Waner D. A., Horie T., Li S. L., Horie R., Abid K. B. y Schroeder J. 2004. Microarray-based rapid cloning of an ion accumulation deletion mutant in Arabidopsis thaliana. *PNAS*. **101**:15404-15409.
- Goldack D, Su H, Quigley F, Muñoz-Garay C, Balderas E, Popova OV, Bennet J, Bohnert HJ , Pantoja O. 2002. Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *Plant J*. **31**:529-542.
- Goldin AL. 1992. Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. In: *Methods in Enzymology*. **207**:266-279.
- Grabov A. 2007. Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: Single family – Multiple functions. *Annals of Botany*. **99**:1035-1041.
- Haro R., Bañuelos M. A., Senn M. E., Gil-Barrero J. Rodríguez-Navarro A. 2005. HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expresión of HKT1 in Yeast. *Plant Physiology*. **139**:1495-1506.
- Haro R. Y Rodríguez-Navarro A. 2003. Functional analysis of the M2D helix of the TRK1 potassium transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA*. **1613**, 1-6.
- Hardie D. G. Plant Protein Serine/Threonine kinases: clasification and functions. 1999. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol*. **50**:97-131.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. 1994. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*. **66**:1061-1067.
- Hetherington M. A y Brownlee C. 2004. The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. **55**:401-427.
- Hoagland D. R. y Arnon D. I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Exp. Stn. Circ*. **347**:1-39.
- Horie T., Yoshida K., Nakayama H., Yamada K., Oiki S. y Shinmyo A. 2001. Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant Physiology*. **27**:129-138.

- Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, Leung HY, Miyao A, Hirochika H, An G, Schroeder JI. 2007. Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO J.* **26**:3003-3014.
- Hu Y. C., Schyder H., Schmidhalter U. 2000. Carbohydrate deposition and partitioning in elongating leaves of wheat under saline soil conditions. *Australian Journal of Plant Physiology.* **122**: 747-756.
- Huang S, Spielmeyer W, Lagudah ES, James RA, Platten JD, Dennis ES, Munns R. 2006. A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiol.* **142**:1718-27.
- Kato Y., Sakaguchi M., Mori Y., Saito K., Nakamura T., Bakker E. P., Sato Y., Goshima S., y Uozumi N. 2001. Evidence in support of a four transmembrane pore-transmembrane topology model for the Arabidopsis thaliana Na⁺K⁺ translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K⁺ transporters. *PNAS.* **98**: 6488-6493.
- Kyu-Seong I., Weon-Young C., Jong-Cheol K., Tae-Soo K y Glenn B. G. 2003. Salinity tolerance of japonica and indica rice (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. *Planta.* **216**: 1043-1046.
- Marschner H. 1988. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London
- Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F. 2005. High-affinity K⁺ uptake in pepper plants. *Journal of Experimental Botany.* **56**: 1553–1562.
- Mäser P, Hosoo Y, Goshima S, Horie T, Eckelman B, Yamada K, Yoshida K, Bakker EP, Shinmyo A, Oiki S, Schroeder JI, Uozumi N. 2002. Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four loop-per-subunit HKT transporters from plants. *PNAS.* **99**:6428-6433
- Maathuis F. J. M., Verlin D., Smith F. A., Sanders D., Fernández J. A., y Walker N. A. 1996. The Physiological Relevance of Na⁺-Coupled K⁺-Transport. *Plant Physiol.* **112**: 1609-1616.
- Mohr H. Y Schopfer P. 1995. *Plant Physiology.* Springer.
- Munns Rana. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist.* **167**: 645–663.

- Nannette M., Bichet D. G., Lonergan M., Arthus M-F., Jeck N., Seyberth H. W., Rosenthal W., Van Os H C., Oksch A. Y Deen P. M. T. 2002. Heteroligomerization of an aquaporin-2 mutant with wild-type aquaporine-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *Human Molecular Genetics*. **11**: 779-789.
- Neuhäuser B., Dynowski M., Mayor M. Y Ludewig U. 2007. Regulation of NH_4^+ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. *Plant Physiology*. **143**: 1651-1654.
- Platten D. J., Cotsaftis O., Berthomieu P., Bohnert H., Davenport R. J., Fairbairn D. J., Horie T., Leigh R. A., Lin Hong-Xuan, Luan S., Mäser P., Pantoja O., Rodríguez-Navarro A., Schachtman D. P., Schroeder J. I., Sentenac H., Uozumi N., Véry Anne-Aliénor, Zhu Jian-Kang, Dennis E. S.y Tester M. 2006. Nomenclature for *HKT* transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci*. **11(8)**:372-4.
- Ren Z.H., Gao J.P., Li L.G., Cai X. L., Huang W., Chao D. Y., Zhu M. Z., Wang Z. Y., Luan S. y Lin H. X. 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature genetics*. **37**:1141-1146.
- Rodríguez-Navarro A. y Rubio A. 2006. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*. **57**: 1149-1160.
- Ros R., Lemaillet G., Fonrouge A.G., Daram P., Enjutob M., Salmon J.M., Thibaud J.B. y Sentenac H. 1999. Molecular determinants of the *Arabidopsis* AKT1 K^+ channel ionic selectivity investigated by expression in yeast of randomly mutated channels. *Physiologia Plantarum*. **105**: 459-468.
- Roux B. & MacKinnon R. 1999. The cavity and pore helices in the KcsA K^+ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science*. **285**:100-102.
- Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI. 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*. **270**:1660- 1663.
- Rubio F, Schwarz M, Gassmann W, Schroeder JI. 1999. Genetic selection of mutations in the high affinity K^+ transporter HKT1 that define functions of a

- loop site for reduced Na⁺ permeability and increased Na⁺ tolerance. *J Biol Chem.* **274**:6839-6847.
- Rubio F, Santa-Maria GE, Rodríguez-Navarro A. 2000. Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum.* **109**: 34–43.
- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B., Matsumoto T. K., Koiwa H., Zhu J. K., Bressan R. A. y Hasegawa P. M. 2001. *AtHKT1* is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *PNAS.* **98**:14150-14155.
- Santa-María GE, Danna CH, Czibener C. 2000. High-affinity potassium transport in barley roots: ammonium-sensitive and -insensitive pathways. *Plant Physiology.* **123**: 297–306.
- Santa-Maria GE., Rubio F., Dubcovsky J. y Rodríguez-Navarro A. 1997. The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high affinity potassium transporter. *The plant cell.* **9**:2281-2289.
- Schachtman D P. & Schroeder JI. 1994. Structure and transport mechanism of a high affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature.* **370**:655-658.
- Schulze W. X., Reinder A., Ward J., Lalonde S. Y Frommer W. B. 2003. Interactions between co-expressed Arabidopsis sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC Biochemistry.* **4**:3.
- Shi H., Ishitani M., Kim C., y Zhu J-K. 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerante gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *PNAS.* **97**:6896-6901.
- Spalding e. P., Hirsch R. E., Lewis D. R., Qi Z., Sussman M. R., Lewis B. D. 1999. Potassium uptake supporting plant growth in the absence of *AKT1* channel activity. Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *The Journal of General Physiology.* **113**: 909-918.
- Sentenac H., Boneaud N., Minet M., Lacroute F., Salmon J. M., Gaymard F., Grignon. 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science.* **256**: 663-665.
- Suelter C. H. 1970. Enzymes Activated by Monovalent Cations. *Sciencie* **168**:789-795.

- Su H, Balderas E, Vera-Estrella R, Gollack D, Quigley F, Zhao C, Pantoja O, Bohnert HJ. 2003. Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant Mol. Biol.* **52**:967-980
- Tester M. & Davenport R. 2003. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. *Annals of Botany.* **91**, 503-527.
- Talke IN, Blaudez D, Maathuis FJM, Sanders D. 2003. CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling?. *Trends In Plant Science.* **8**: 286–293.
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T, Schroeder JI. 2000. The Arabidopsis HKT1 gene homologue mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* **122**:1249-59.
- Véry AA. & Sentenac H. 2003. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**:575-603.
- White P. J. 1999. The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Trends Plant Sci.* **4**:245-246.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Diferentes familias de transportadores de cationes alcalinos.....	6
Topología de los transportadores HKT.....	10
Alineamiento de varias secuencias en el segmento P _A pertenecientes a diferentes transportadores HKT.....	11
Árbol filogenético de los transportadores HKT.....	13
Oligos usados para las reacciones de PCR.....	23
Planta de arroz.....	29
OsHKT1;3 es un mecanismo de transporte de Na ⁺	31
OsHKT1;3 es más selectivo al Na ⁺ que al K ⁺	32
Los ovocitos control poseen corrientes endógenas entrantes en presencia de K ⁺	33
OsHKT1;3 tiene una mayor afinidad a Na ⁺ que a K ⁺	36
Cambios en E _r dependientes de las concentraciones extracelulares de Na ⁺ o K ⁺	37
La presencia simultanea de K ⁺ y Na ⁺ no afecta los cambios en el potencial de inversión.....	38
OsHKT1;3 es un transportador altamente selectivo a Na.....	41
La conductancia de OsHKT1;3 es constante a diferentes concentraciones extracelulares de Na ⁺	42
Selectividad de OsHKT1;3 hacia los cationes alcalinos.....	44
OsHKT1;3 es selectivo a Na ⁺	45
OsHKT2;3 transporta K ⁺	47
OsHKT2;3 transporta Na ⁺	48
OsHKT2;3 tiene una baja afinidad hacia Na ⁺	49
OsHKT2;3 transporta a todos los cationes alcalinos.....	51
OsHKT2;3 no discrimina entre los diferentes cationes alcalinos.....	52
Sitios de expresión del ARNm de OsHKT1;3 y su regulación por la deficiencia de K ⁺ , y por estrés salino.....	55
Sitios de expresión de OsHKT2;3 y su regulación por la imposición de estrés salino y la ausencia de K ⁺	56
Expresión de OsHKT1;3 y OsHKT2;3 en diferentes líneas de plantas transgénicas en el fondo mutante <i>Athkt1;1</i>	59