



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y  
REGULACIÓN DE LA ACUAPORINA *McPIP2;1*  
DE *Mesembryanthemum crystallinum* EN  
RESPUESTA A SALINIDAD Y ESTRÉS  
OSMÓTICO

**T E S I S**

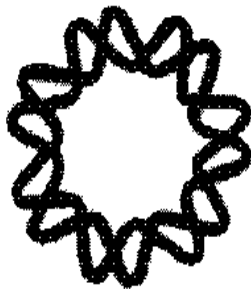
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**M.C. JULIO CÉSAR AMEZCUA ROMERO**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSARIO VERA ESTRELLA



CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*At judgement day every man  
will have to give account for  
every good thing which he  
might enjoyed and did not*

Jerusalem Kidrishin, 66d

*Water is not a commercial product  
like any other but, rather, a heritage  
which must be protected, defended  
and treated as such*

Consejo directivo del agua de la Unión Europea

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM y al IBT por todo el apoyo institucional que recibí de su parte.

Al CONACYT por la beca que me otorgó para realizar el doctorado.

A la DGAPA por la beca que me otorgó para elaborar y concluir la tesis.

A la Dra. Rosario Vera Estrella por ser más que una tutora, una amiga. Muchísimas gracias por todo el apoyo y la confianza que me diste. Espero haber aprovechado y adquirido, al menos, un poco de tu sabiduría, inteligencia, perspicacia, voluntad y disposición para la ciencia.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruíz y al Dr. Gustavo Pedraza Alva por sus comentarios y sugerencias sobre el proyecto de tesis durante los tutorales, y por haber demostrado interés en mi formación académica.

A la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles, a la Dra. María del Rocío Cruz Ortega, a la Dra. Gladys Iliana Cassab López, a la Dra. Helena Porta Ducoing y al Dr. Enrique Rudiño Piñera por haber aceptado ser parte de mi jurado de examen para la obtención del grado, y por sus comentarios y sugerencias sobre la tesis.

A la Dra. Bronwyn Barkla y al Dr. Omar Pantoja por sus comentarios, sugerencias y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A la Técnico Laboratorista Guadalupe Muñoz García y a la Secretaria Adriana Monserrat por todo el apoyo técnico que recibí de su parte y por su amistad.

Al M. en C. Andrés Saralegui Amaro por enseñarme a utilizar el microscopio confocal.

A Marcela, Carlos, Eric, Paul, Josué, Matilde, Maricris, Enrique, Ruth, Liliana, Armando, Vadim, Dios y a todos los que han estado en el laboratorio, así como a Ale, Odette, Mario, Zuemy, Christian, Greta, María, Enrique Murillo (†) por su amistad y por la convivencia y los momentos de alegría compartidos.

A los del equipo de voli (Rosario, Nore, Pavel, Fer, Gerardo, Esteban, Itzcoatl, y a todos los que han estado en el equipo) por los momentos de alegría, diversión y uno que otro de frustración compartidos los miércoles.

A mis padres, José y Evangelina, por su amor y apoyo incondicionales. Los amo.

A Lolo por su cariño y apoyo durante toda mi vida, y por la dicha de hacerme tío de dos pequeñas preciosas, Marijo y Marifer, a quienes adoro.

A Iskra por su amor, comprensión y apoyo en esta etapa de mi vida.

A mis abuelos, tíos y primos por todo su cariño y apoyo siempre, en cualquier etapa de mi vida. Tía Guille, tío Ricardo, Rocío, Bea, Ricardo, muchas gracias por estar conmigo y apoyarme en momentos decisivos de mi vida profesional.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
Salinidad de los suelos	14
Estrés iónico	15
Efectos del estrés iónico en las plantas	15
Mecanismos de tolerancia al Na <sup>+</sup>	16
Estrés osmótico	17
Potencial hídrico	17
Efectos del estrés osmótico en las plantas	18
Mecanismos de tolerancia al estrés osmótico	19
Halófitas vs glicófitas	20
Consumo y transporte de agua por las raíces	22
Propiedades anatómicas e hidráulicas de las raíces	22
Fuerzas conductoras del movimiento del agua en las raíces	24
Cambios en las propiedades hidráulicas de las raíces bajo condiciones de salinidad y sequía	25
Acuaporinas	25
Estructura y selectividad de transporte de las acuaporinas	25
La familia de las acuaporinas en las plantas	30
Funciones fisiológicas de las acuaporinas en las plantas	30
Regulación de las acuaporinas	31
Fosforilación	31
pH y Ca <sup>2+</sup>	32
Oligomerización	34
Tráfico membranal	35
Glicosilación	36
ANTECEDENTES	37
JUSTIFICACIÓN	38
HIPÓTESIS	40

OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Expresión heteróloga en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	41
Consumo de solutos radiactivos por ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	42
Mutagénesis puntual dirigida	42
Ensayos de hinchamiento de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	42
Aislamiento de membranas de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	43
Homogenado crudo	43
Método estándar	43
Cuentas de sílice	43
Cuantificación de proteínas de membrana	44
Ensayos enzimáticos con marcadores de membranas	44
Alineamientos y modelos estructurales de McPIP2;1	44
Análisis de datos	45
Material vegetal y condiciones de crecimiento	45
Aislamiento de microsomas de las raíces de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	46
Separación de microsomas mediante gradientes continuos (5%-46% [p/v]) de sacarosa	46
Separación de microsomas por electroforesis zonal de flujo libre (EZFL)	47
Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con sulfato dodecilo de sodio (SDS) y detección inmunológica de proteínas inmovilizadas (Western blotting)	48
Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> e inmunoprecipitación	49
Inmunolocalización y microscopia confocal de barrido con láser	49
RESULTADOS	51
McPIP2;1 es un canal de agua funcional	51
McPIP2;1 no transporta ni glicerol ni urea	54
La actividad de McPIP2;1 como canal de agua está regulada positivamente por fosforilación mediada por PCA y PCC	55
La actividad de McPIP2;1 como canal de agua está regulada por los residuos Ser <sup>123</sup> y Ser <sup>282</sup>	59
McPIP2;1 se localiza subcelularmente en tres grupos de membranas: retículo endoplásmico/complejo de Golgi, tonoplasto y membrana plasmática	61
La salinidad y el estrés osmótico aumentan los niveles de proteína de McPIP2;1 pero no afectan su distribución subcelular	65
McPIP2;1 se fosforila en la membrana plasmática y su nivel de fosforilación aumenta en respuesta a sal	69
McPIP2;1 se localiza en células de la epidermis, de la endodermis y del tejido vascular de la raíz de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	71
La salinidad y el estrés osmótico inducen la expresión de McPIP2;1 en todas las células cercanas a la punta de la raíz de	73

*Mesembryanthemum crystallinum*

DISCUSIÓN	74
Selectividad de transporte de <i>McPIP2;1</i>	74
Regulación de la actividad de <i>McPIP2;1</i> como canal de agua por fosforilación	74
Función de los residuos Ser <sup>123</sup> y Ser <sup>282</sup> en la actividad de <i>McPIP2;1</i> como canal de agua	76
Localización subcelular de <i>McPIP2;1</i> durante el crecimiento y desarrollo de las raíces de <i>M. crystallinum</i> y en respuesta a salinidad y estrés osmótico	81
Distribución celular de <i>McPIP2;1</i> a lo largo de la raíz primaria de <i>M. crystallinum</i> bajo condiciones de salinidad y estrés osmótico	86
CONCLUSIONES	91
PERSPECTIVAS	92
BIBLIOGRAFÍA	94



## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Pág.
1	Organización tisular en las raíces de soya y maíz.	22
2	Representación esquemática de las tres rutas involucradas en el transporte del agua a través de la raíz.	23
3	Modelo de una acuaporina mostrando sus características principales.	27
4	Características estructurales conservadas en la familia de las acuaporinas.	28
5	Esquema funcional para el paso del agua a través de las acuaporinas.	29
6	Determinación de la actividad de <i>McPIP2;1</i> como un canal selectivo para el transporte de agua.	52
7	Modelo topológico de un monómero de <i>McPIP2;1</i> .	55
8	Regulación de la actividad de <i>McPIP2;1</i> como canal de agua por fosforilación mediada por PCA y PCC.	57
9	Los residuos Ser <sup>123</sup> y Ser <sup>282</sup> son necesarios para la actividad de <i>McPIP2;1</i> como canal de agua.	60
10	Localización de <i>McPIP2;1</i> en membranas subcelulares de la raíz de <i>M. crystallinum</i> en respuesta a salinidad y estrés osmótico.	62
11	Distribución de <i>McPIP2;1</i> en membranas subcelulares de la raíz de <i>M. crystallinum</i> purificadas mediante EZFL.	64
12	Distribución de <i>McPIP2;1</i> en membranas subcelulares aisladas de raíces de <i>M. crystallinum</i> tratadas con sal y purificadas mediante EZFL.	67
13	Distribución de <i>McPIP2;1</i> en membranas subcelulares aisladas de raíces de <i>M. crystallinum</i> bajo estrés osmótico y separadas mediante EZFL.	68
14	Fosforilación de <i>McPIP2;1</i> en fracciones de membrana plasmática purificadas de la raíz de <i>M. crystallinum</i> mediante EZFL.	70
15	Localización inmunofluorescente de <i>McPIP2;1</i> a lo largo del eje de crecimiento de la raíz de <i>M. crystallinum</i> .	72

16	Localización inmunofluorescente de <i>McPIP2;1</i> a lo largo del eje de crecimiento de la raíz de <i>M. crystallinum</i> (control preinmune).	73
17	Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de las AQPs <i>McPIP2;1</i> y <i>SoPIP2;1</i> .	77
18	Modelos estructurales de <i>McPIP2;1</i> en sus conformaciones cerrada y abierta.	78
19	Comparación de las secuencias de aminoácidos de las AQPs <i>McPIP2;1</i> , <i>SoPIP2;1</i> , <i>ZmPIP2;1</i> y <i>PvTIP3;1</i> .	79

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>No.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Actividades enzimáticas de marcadores de membrana en homogenizado crudo de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> y en membranas aisladas siguiendo el método estándar o el método de cuentas de sílice.	53

## ABREVIATURAS

ABA	-	Ácido abscísico
AC	-	Adenilato ciclasa
ADN	-	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	-	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN-T	-	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
AMP	-	Monofosfato de adenosina
AMPc	-	Monofosfato de adenosina cíclico
AO	-	Ácido okadaico
AQP	-	Acuaporina
ARN	-	Ácido ribonucleico
ARNc	-	Ácido ribonucleico complementario
ARN-i	-	Ácido ribonucleico de interferencia
ar/R	-	Aromático/arginina
ASB	-	Albúmina sérica bovina
8-Br-AMPc	-	8-Bromoadenosina-3',5'-cíclica monofosfato
DAG	-	Diacilglicerol
DEPC	-	Dietil pirocarbonato
DMSO	-	Dimetil sulfóxido
DTT	-	Ditiotreitol
EDTA	-	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	-	Ácido etilenglicoltetraacético
EZFL	-	Electroforésis zonal de flujo libre
FDE	-	Fosfodiesterasa alcalina
FMA	-	Forbol 12-miristato 13-acetato
FS	-	Fosfatidilserina
GMP	-	Monofosfato de guanosina
GMPc	-	Monofosfato de guanosina cíclico
HIPs	-	Proteínas integrales híbridas
L <sub>p</sub>	-	Conductividad hidráulica
MBS	-	Éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida
MES	-	Ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico
MIPs	-	Proteínas integrales de membrana
MP	-	Membrana plasmática
NIPs	-	Proteínas integrales parecidas a la nodulina 26
PAGE	-	Electroforésis en geles de poliacrilamida
PCA	-	Proteína cinasa A
PCC	-	Proteína cinasa C
PCDC	-	Proteína cinasa dependiente de calcio o con dominio tipo calmodulina
PIPES	-	Ácido 1,4-piperazindietanosulfónico
PIP <sub>s</sub>	-	Proteínas integrales de membrana plasmática
P <sub>f</sub>	-	Permeabilidad osmótica del agua
PMSF	-	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVP	-	Polivinilpirrolidona
RE	-	Retículo endoplásmico
SDS	-	Sulfato dodecilo de sodio
SIPs	-	Proteínas integrales básicas pequeñas
TBS	-	Amortiguador salino con Tris
TBS-T	-	TBS con Tween 20
TCA	-	Ácido tricloroacético
TEA	-	Trietanolamina
TIPs	-	Proteínas integrales del tonoplasto
TP	-	Tonoplasto
XIPs	-	Proteínas integrales X
14-22	-	Péptido inhibidor de PCA (Myr-GRTGRRNAI-NH <sub>2</sub> )
20-28	-	Péptido inhibidor de PCC (Myr-N-FARKGALRQ-NH <sub>2</sub> )
$\Psi_w$	-	Potencial hídrico
$\Psi_p$	-	Potencial de presión
$\Psi_s$	-	Potencial de soluto
$\Psi_m$	-	Potencial mátrico

## RESUMEN

En este trabajo caracterizamos la actividad y la distribución subcelular y celular de la acuaporina *McPIP2;1*, expresada sólo en las raíces de la halófito *Mesembryanthemum crystallinum*, para comprender su función en el proceso de tolerancia de esta planta a la salinidad y al estrés osmótico. Mediante el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* demostramos que *McPIP2;1* es un canal selectivo para el flujo pasivo del agua, ya que no transporta glicerol ni urea. Los ensayos de hinchamiento y de fosforilación *in vitro* revelaron que la actividad y la fosforilación de *McPIP2;1* aumentaron en respuesta a ácido okadaico, forbol miristato acetato y 8-Br-AMPC, y disminuyeron en presencia de los péptidos 14-22 y 20-28, inhibidores de las proteínas cinasas A (PCA) y C (PCC), respectivamente. La sustitución de la Ser<sup>123</sup> o de ambas, Ser<sup>123</sup> y Ser<sup>282</sup>, inhibió por completo la actividad de *McPIP2;1*, mientras que la sustitución de la Ser<sup>282</sup> sólo la inhibió parcialmente (51.9% de inhibición). *McPIP2;1* se fosforiló *in vitro* en ausencia de la Ser<sup>123</sup> y/o de la Ser<sup>282</sup>. Por lo tanto, la permeabilidad al agua de *McPIP2;1* depende de la Ser<sup>123</sup> y está regulada positivamente por fosforilación mediada por PCA y PCC.

Mediante electroforesis zonal de flujo libre inmunodetectamos a *McPIP2;1* en retículo endoplásmico (RE)/complejo de Golgi, tonoplasto y membrana plasmática (MP). Bajo salinidad (200 mM NaCl por 7 días) localizamos a *McPIP2;1* en dichas membranas y observamos un aumento en su cantidad. Mediante fosforilación *in vitro* encontramos a *McPIP2;1* fosforilada en la MP y mostramos que su nivel de fosforilación aumentó bajo salinidad. Bajo estrés osmótico (200 mM sorbitol por 48 h) aumentó la cantidad de *McPIP2;1* subcelularmente. A nivel celular, inmunolocalizamos a *McPIP2;1* en la epidermis, endodermis y vasos del xilema cercanos a la punta de la raíz; en regiones alejadas encontramos a *McPIP2;1* principalmente en la epidermis. Bajo salinidad y estrés osmótico inmunodetectamos a *McPIP2;1* en la epidermis, corteza, endodermis y vasos del xilema cercanos a la punta de la raíz; en regiones alejadas localizamos a *McPIP2;1* en la epidermis y vasos del xilema bajo salinidad, y en la epidermis bajo estrés osmótico. Por consiguiente, *McPIP2;1* podría estar participando en la regulación del potencial osmótico de la vacuola y del citoplasma, RE y complejo de Golgi, y en la absorción y transporte del agua por las raíces durante la adaptación de la planta a las condiciones de salinidad y estrés osmótico.

## INTRODUCCIÓN

La sequía y la salinidad de los suelos se incluyen entre los principales estreses abióticos que determinan tanto la distribución de las plantas sobre la superficie terrestre como la productividad de los cultivos agrícolas. Estos factores ambientales afectan a más del 10% del área cultivable en el mundo, sin embargo, el aumento progresivo y rápido de los procesos de desertificación y salinización de los suelos, en una escala global, afecta cada vez más la productividad de cultivos agrícolas básicos tales como el maíz, el trigo, la soya y la avena, disminuyendo su producción en más de un 50% (Bray y cols., 2000; Bartels y Sunkar, 2005; Munns y Tester, 2008). La desertificación ocasionada por la erosión hídrica y la erosión eólica es uno de los problemas ambientales más graves en México, ya que afecta al 21.3% del territorio (SEMARNAT, 2008). Los suelos salinos ocupan el 8.4% del territorio nacional, sin embargo, el uso de prácticas agrícolas inadecuadas, tales como la irrigación con agua con un contenido de sales alto, aumenta el riesgo de salinización de los suelos. Aunado a lo anterior, el aumento progresivo de la población humana impone un reto a la agricultura, la cual debe alimentar cada vez a una población mayor mientras compite con el desarrollo urbano por el uso de tierras cultivables. Esta problemática hace que la elucidación y el entendimiento de los mecanismos por los cuales las plantas responden a la sequía y a la salinidad de los suelos sea de fundamental importancia para manipular y aumentar su productividad bajo condiciones ambientales adversas.

## SALINIDAD DE LOS SUELOS

La acumulación de sales en los suelos es un proceso que ocurre de manera natural debido a la erosión de rocas parentales y a la deposición de sales oceánicas transportadas por el viento y la lluvia. La erosión de las rocas parentales libera distintas sales solubles, principalmente cloruros de sodio, calcio, y magnesio, y en menor grado, de sulfatos y carbonatos. El cloruro de sodio (NaCl) es la sal más soluble y abundante en los suelos. El agua de lluvia contiene de 6 a 50 mg/Kg de NaCl, sin embargo, la concentración de NaCl disminuye conforme se aleja de la costa. Aunado a lo anterior, prácticas agrícolas como la irrigación con agua con un contenido de sales alto aumentan la proporción de suelos salinos en todo el mundo (Mahajan y Tuteja, 2005; Munns y Tester, 2008).

Los suelos se clasifican como salinos cuando su conductividad eléctrica es igual o mayor a 4.0 dS/m, lo que es equivalente a una concentración de 40 mM NaCl y a una presión osmótica de 0.2 MPa (Munns y Tester, 2008). Este valor de conductividad eléctrica se determinó con base en la disminución de la producción observada en la mayoría de los cultivos agrícolas bajo dicha condición salina.

La exposición de las plantas a un aumento en las concentraciones de sales en el suelo provoca un estrés iónico en éstas debido a la acumulación intracelular de las sales a niveles tóxicos. Aunado al estrés iónico, la salinidad de los suelos, al igual que

la sequía, provoca un estrés osmótico en las plantas debido al cual se dificulta la absorción del agua por las raíces y se tiene como consecuencia la deshidratación de las mismas (Bartels y Sunkar, 2005; Mahajan y Tuteja, 2005).

## **ESTRÉS IÓNICO**

### **Efectos del estrés iónico en las plantas**

Los síntomas generales de daño por estrés salino (NaCl) en las plantas son la inhibición del crecimiento, el desarrollo acelerado y la senescencia, e inclusive la muerte durante una dosis severa y una exposición prolongada. El estrés salino induce la síntesis de ácido abscísico (ABA) en las plantas, el cual a su vez induce el cierre de los estomas, y en consecuencia, se tiene el decaimiento de los procesos de transpiración y fotosíntesis, debido al cual se estimula tanto el proceso de fotoinhibición como la generación de un estrés oxidativo, procesos que inducen un daño severo en las plantas (Zhu, 2001a).

Los síntomas de daño en las plantas debidos específicamente al componente iónico del estrés salino están asociados con la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  en las hojas. Dicha acumulación tiene como resultado la necrosis de las hojas viejas, la cual comienza en las puntas y márgenes y se extiende por toda la hoja (Munns, 1993; 2002). Las hojas son más vulnerables al  $\text{Na}^+$  que las raíces debido a que el  $\text{Na}^+$  se acumula principalmente en la parte aérea de las plantas. El movimiento del  $\text{Na}^+$  desde el suelo hasta el interior de las raíces y su transporte hacia la parte aérea de las plantas se debe al flujo de transpiración a través del xilema. Por su parte, las raíces tienden a mantener niveles constantes de  $\text{Na}^+$  mediante la expulsión de este ión hacia el suelo o hacia la parte aérea (Hasegawa y cols., 2000; Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008). Por lo tanto, la reducción en el crecimiento de las plantas y en la productividad de los cultivos agrícolas bajo condiciones salinas se debe en parte al acortamiento del tiempo de vida de las hojas. La escala de tiempo en la cual se manifiestan los daños por estrés iónico puede ser de días, semanas o meses, dependiendo de la cantidad de sodio en el suelo, de la velocidad de acumulación de los iones  $\text{Na}^+$  en las hojas y de la efectividad de los procesos de exclusión y compartimentalización de dichos iones en las células y tejidos de las plantas.

La deficiencia de nutrientes minerales en las plantas es otro de los efectos del estrés iónico ocasionado por concentraciones altas de NaCl en el suelo, ya que una de las consecuencias de la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en las células vegetales es la disminución de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , iones esenciales para los procesos de nutrición celular. Debido a que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  son químicamente similares, el  $\text{Na}^+$  compite por los sitios de unión del  $\text{K}^+$ , por ejemplo, el  $\text{Na}^+$  tiene un efecto inhibitorio fuerte sobre los transportadores de  $\text{K}^+$ , tales como los canales iónicos selectivos a  $\text{K}^+$  presentes en la membrana plasmática de la raíz (Zhu, 2001a; Tester y Davenport, 2003). Bajo condiciones fisiológicas no estresantes, las plantas mantienen una relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  alta en el citosol, con niveles relativamente altos de  $\text{K}^+$  (100-200 mM) y bajos



para el  $\text{Na}^+$  (1-10 mM) (Pantoja y cols., 2000). La toxicidad metabólica del  $\text{Na}^+$  resulta de su habilidad para competir con el  $\text{K}^+$  como cofactor de un gran número de enzimas citosólicas, p.e. la piruvato cinasa y la fosfofructocinasa involucradas en la glicólisis, que no pueden ser activadas por  $\text{Na}^+$  (Bhandal y Malik, 1988; Marschner, 1995; Orcutt y Pilsen, 2000). Además, la síntesis de proteínas requiere de concentraciones altas de  $\text{K}^+$  debido al requerimiento de éste ión para la unión de los ARNt a los ribosomas (Blaha y cols., 2000). De ésta manera, la interrupción de la síntesis de proteínas es una causa importante de daño por  $\text{Na}^+$ .

Por otra parte, los efectos del ión  $\text{Cl}^-$  sobre las plantas también se relacionan con la acumulación tóxica de dicho ión en las hojas. Plantas como la soya, el aguacate, la uva y el limón presentan concentraciones altas de  $\text{Cl}^-$  en respuesta a estrés salino ( $\text{NaCl}$ ), alterando la homeostasis iónica de sus células. La entrada del  $\text{Cl}^-$  en las células de las raíces y su posterior carga en el xilema probablemente están mediadas por mecanismos de transporte activos y pasivos, respectivamente, tales como simportadores  $\text{Cl}^-/2\text{H}^+$  y canales aniónicos (Munns y Tester, 2008). Sin embargo, se desconoce la identidad de dichos transportadores así como los mecanismos que regulan su expresión y actividad.

### **Mecanismos de tolerancia al $\text{Na}^+$**

Para contender con el estrés iónico originado por el ión  $\text{Na}^+$  las plantas han desarrollado principalmente dos mecanismos de respuesta: 1) restringir la entrada del  $\text{Na}^+$  en las raíces y 2) retirar al  $\text{Na}^+$  del citoplasma, ya sea mediante su transporte de regreso al medio extracelular o mediante su compartimentalización en la vacuola.

El  $\text{Na}^+$  entra en las raíces de manera pasiva a través de canales de cationes no-selectivos independientes de voltaje y posiblemente mediante otros transportadores de  $\text{Na}^+$  tales como algunos miembros de la familia HKT de transportadores de  $\text{K}^+$  de alta afinidad. Por lo tanto, mediante la regulación de estos transportadores las plantas pueden restringir la entrada del  $\text{Na}^+$  en sus raíces. La exclusión del  $\text{Na}^+$  por las raíces asegura que dicho ión no alcance concentraciones tóxicas dentro de las hojas (Munns y Tester, 2008).

El  $\text{Na}^+$  que entra en las células vegetales puede ser bombeado de regreso al medio extracelular por medio de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizados en la membrana plasmática, tales como SOS1. Los intercambiadores de cationes de la familia CHX y las ATPasas transportadoras de  $\text{Na}^+$  también pueden ser importantes para la exclusión del  $\text{Na}^+$  hacia el medio extracelular (Munns y Tester, 2008). Así mismo, la compartimentalización del  $\text{Na}^+$  en las vacuolas se lleva a cabo mediante intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  presentes en el tonoplasto, los cuales pertenecen a la familia de intercambiadores NHX (Rodríguez-Rosales y cols., 2009). Estos intercambiadores utilizan la diferencia en el potencial electroquímico para el  $\text{H}^+$ , la cual se genera entre la vacuola y el citoplasma debido a las bombas de protones  $\text{H}^+$ -ATPasa y pirofosfatasa localizadas en el tonoplasto, para energizar el transporte del  $\text{Na}^+$  hacia el interior de la vacuola (Tester y Davenport, 2003; Bartels y Sunkar, 2005). Por consiguiente, la

exclusión del  $\text{Na}^+$  del citoplasma ya sea hacia el espacio extracelular o hacia el interior de la vacuola mejora la tolerancia de las plantas al estrés salino.

## ESTRÉS OSMÓTICO

### Potencial hídrico

El agua es el solvente universal requerido para las actividades bioquímicas de todas las formas de vida conocidas. Para las células vegetales, la presión de turgor generada por el agua es también la fuerza inductora de la expansión celular. Sin embargo, el crecimiento vegetativo de las plantas ocurre solamente cuando se alcanzan ciertos niveles hídricos determinados por el contenido de energía libre de las moléculas de agua también llamado potencial hídrico ( $\Psi_w$ , Salisbury y Ross, 1992a; Xiong y Zhu, 2002). El potencial hídrico de una planta se utiliza para evaluar el grado de hidratación de una célula, de un órgano o del organismo completo y es igual a la suma de varios potenciales:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m$$

El potencial de soluto ( $\Psi_s$ , también llamado potencial osmótico) está dictado por el número de partículas disueltas en el agua y siempre es negativo (o cero en agua pura), debido a que la adición de partículas de soluto siempre disminuye el potencial hídrico por debajo del valor obtenido para el agua pura. El potencial de presión ( $\Psi_p$ ) refleja las fuerzas físicas ejercidas sobre el agua por su ambiente circundante; puede tener cualquier valor y, por convención, el  $\Psi_p$  es igual a cero bajo las condiciones de presión atmosférica. Cuando el agua está sujeta a presión negativa (tensión), el  $\Psi_p$  es menor a 0 MPa (megapascuales) y el  $\Psi_w$  disminuye. En contraste, el potencial hídrico se incrementa ante presiones positivas tales como el turgor ( $\Psi_p$  mayor de 0 MPa). El potencial gravitacional ( $\Psi_g$ ) tiene un efecto sustancial cuando el agua se transporta a distancias verticales mayores de 5 a 10 m, sin embargo, se puede omitir cuando se describe el transporte entre células o dentro de plantas pequeñas. El potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) explica cómo las superficies sólidas (por ejemplo, las paredes celulares) interactúan con el agua y reducen el  $\Psi_w$ . Sin embargo, dado que los valores del  $\Psi_m$  son muy pequeños y difíciles de medir, por lo general se ignora el impacto del  $\Psi_m$  sobre el potencial hídrico (Salisbury y Ross, 1992b; Hopkins, 1995a).

El potencial hídrico se utiliza para predecir el movimiento del agua hacia el interior o hacia el exterior tanto de una célula como de un tejido, órgano o de la planta completa. La diferencia en el potencial hídrico entre la planta y el suelo o a través de una membrana (ya sea la membrana plasmática, el tonoplasto o las membranas de otros organelos) determina la dirección del flujo. El agua se mueve espontáneamente de una región con un potencial hídrico alto hacia una región con un potencial hídrico bajo (Bray y cols., 2000). El potencial hídrico del suelo se ve afectado severamente por condiciones ambientales como la salinidad y la sequía, las cuales provocan cambios

significativos en el potencial hídrico del suelo que imponen un estrés osmótico en las plantas.

### **Efectos del estrés osmótico en las plantas**

La sequía y la salinidad de los suelos provocan un déficit hídrico o deficiencia de agua en las plantas que tiene como resultado la deshidratación de estas. Ambos factores ambientales dificultan la absorción del agua por las raíces debido a que disminuyen el potencial hídrico del suelo, y por tanto favorecen la pérdida del agua por las plantas. La disminución del potencial hídrico del suelo se debe a que ambos factores ambientales aumentan el potencial osmótico de este, en el caso de la sequía debido a la falta de agua y en el caso de la salinidad debido a la acumulación de sales (Munns, 2002; Munns y Tester, 2008). La remoción del agua circundante de las membranas celulares interrumpe la estructura normal de la bicapa y las hace muy porosas. La afectación que ocurre dentro de la bicapa lipídica también tiene como consecuencia el desplazamiento de las proteínas de membrana, lo que contribuye con la pérdida de integridad y selectividad de las membranas, con la interrupción de los procesos de compartimentalización celular y con la pérdida de actividad de enzimas embebidas o asociadas a las membranas. Además del daño ocasionado a las membranas celulares, las proteínas citosólicas y las de los organelos pueden exhibir una actividad reducida o incluso se llegan a desnaturalizar por completo cuando se deshidratan. Aunado a lo anterior, el aumento de la concentración de electrolitos celulares debido a la deshidratación del protoplasma también afecta el metabolismo celular (Mahajan y Tuteja, 2005; Parida y Das, 2005).

A nivel de la planta, el principal efecto visible producido por el estrés osmótico es el marchitamiento o pérdida de turgor de las hojas, proceso que ocurre en minutos u horas, dependiendo de la capacidad de la planta para tolerar la falta de agua. Como consecuencia de la pérdida de turgor se detiene el crecimiento vegetativo de las plantas, particularmente en la parte aérea. La velocidad de expansión de las hojas se reduce, las hojas nuevas emergen tardíamente, y las yemas laterales se desarrollan más lentamente o permanecen quiescentes por lo que se forman menos ramas (Munns y Tester, 2008). Se propone que la inhibición y/o lentitud del crecimiento se deben a una reducción de la actividad de cinasas dependientes de ciclina, las cuales regulan el proceso de división celular. Por lo general, el crecimiento de la parte aérea de las plantas es más sensible que el crecimiento de las raíces. La reducción del crecimiento de las hojas es benéfica para las plantas bajo condiciones de deficiencia de agua debido a que se expondría una menor superficie de hoja a la pérdida de agua mediante el proceso de transpiración. Por otra parte, el crecimiento sostenido de las raíces facilitaría la extracción de agua de capas de suelo más profundas (Mahajan y Tuteja, 2005). Estos efectos pueden ser temporales o constitutivos, dependiendo de la duración, magnitud y forma de aplicación (rápida o gradual) del estrés, así como del tejido y de la especie de planta en particular (Hopkins, 1995b; Munns, 2002; Bartels y Sunkar, 2005).

El estrés osmótico induce la síntesis de ABA en las plantas, debido al cual se cierran los estomas y se tiene como consecuencia la reducción de los procesos fisiológicos de transpiración y fotosíntesis (Bartels y Sunkar, 2005; Mahajan y Tuteja, 2005; Parida y Das, 2005). Además, un efecto secundario de la deshidratación de las plantas es la acumulación de especies de oxígeno reactivas (ROS) tales como el singulete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ), los radicales superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Bartels y Sunkar, 2005). Los cloroplastos son el sitio principal de generación de ROS en tejidos fotosintéticos. En dichos organelos se producen cantidades altas de superóxido y peróxido de hidrógeno, especialmente cuando se reduce la fijación fotosintética del carbono, situación que ocurre típicamente bajo condiciones de sequía y salinidad. Aunado a lo anterior, los cloroplastos pueden producir al singulete de oxígeno mediante la transferencia directa de energía de moléculas de clorofila excitadas. En los tejidos no fotosintéticos las mitocondrias son los suministros principales de ROS, sin embargo, en los tejidos fotosintéticos la contribución de las mitocondrias es menor en comparación con la de los cloroplastos. Los peroxisomas son otro de los sitios intracelulares productores de ROS. Estos organelos contienen varias oxidasas (p.e. la glicolato oxidasa) que producen superóxido y peróxido de hidrógeno como subproductos de las reacciones que catalizan durante el proceso de fotorespiración. El estrés producido por la sequía y la salinidad de los suelos provoca el cerrado de los estomas (inducido por el ABA), razón por la cual se reduce la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  para la planta y se favorece la fotorespiración, teniendo como consecuencia el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno. Las NADPH oxidasas también son importantes en la generación de ROS en las plantas mediante la producción del radical superóxido el cual se dismuta rápidamente en peróxido de hidrógeno (Foyer y Noctor, 2009; Jaspers y Kangasjärvi, 2010). El peróxido de hidrógeno inactiva a las enzimas mediante la oxidación de sus grupos tioles, sin embargo, su mayor toxicidad se debe a que en presencia de un metal reductor puede generar al radical hidroxilo, el cual es extremadamente reactivo y puede reaccionar potencialmente con todas las moléculas biológicas, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, ocasionando un daño oxidante extensivo en las células.

### **Mecanismos de tolerancia al estrés osmótico**

La primera respuesta de las plantas a un déficit hídrico como aquel originado durante la sequía y la salinidad es el cerrado de sus estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración. La regulación de la transpiración a través de los poros de los estomas es una respuesta crucial de las plantas para contender con el estrés osmótico (Munns y Tester, 2008). Las células guarda, las cuales dan forma a los poros de los estomas, integran y responden de manera apropiada a los cambios de los niveles de agua en la planta utilizando al ABA como señal principal. El cerrado de los estomas inducido por ABA se debe a la reducción de la presión de turgor de las células guarda, para lo cual se requiere de la salida de los iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , así como de la conversión de malato a almidón, un compuesto inactivo osmóticamente. El ABA dispara un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en las células guarda lo que regula a los canales iónicos que controlan la salida de los iones y el cerrado de los estomas (Mahajan y Tuteja, 2005). Además de inducir el cerrado de los estomas, el ABA induce la expresión de genes que

participan en la acumulación de osmoprotectores, en la expresión de proteínas LEA, y en general en la señalización y en la regulación transcripcional de componentes celulares asociados con la tolerancia al estrés (Bartels y Sunkar, 2005).

Además de cerrar sus estomas, las plantas contienen con el déficit hídrico provocado por el estrés osmótico mediante el proceso denominado ajuste osmótico. Durante este proceso, las plantas aumentan el potencial osmótico de sus células mediante la acumulación de solutos para así reducir su potencial hídrico y evitar o reducir, de ésta manera, la pérdida de agua hacia el suelo. A los solutos que se acumulan, principalmente en el citoplasma, durante el proceso de ajuste osmótico se les denomina solutos compatibles ya que no intervienen, y por tanto, no inhiben las rutas metabólicas esenciales para el crecimiento y desarrollo celular (Hasegawa y cols., 2000). Los compuestos que se acumulan más comúnmente en las plantas bajo condiciones de sequía y salinidad son azúcares (sacarosa y trealosa), polioles cíclicos (D-pinitol, D-ononitol), aminoácidos (prolina) y metabolitos con carga (glicina betaína). Además de tener una función en la regulación de la homeostasis osmótica de las células, los osmolitos compatibles pueden estar involucrados en la estabilización de proteínas y membranas celulares así como en la remoción de ROS, actuando como osmoprotectores (Bartels y Sunkar, 2005; Mahajan y Tuteja, 2005). Los solutos compatibles son típicamente hidrofílicos, lo que sugiere que pueden reemplazar el agua que se encuentra en contacto con la superficie de las proteínas, de los complejos proteicos o de las membranas, actuando, de esta manera, como chaperonas de bajo peso molecular para mantener estables a las estructuras celulares.

La tolerancia al estrés oxidativo está correlacionada con un sistema antioxidante eficiente. Los mecanismos de desintoxicación de ROS se dividen en mecanismos no enzimáticos y mecanismos enzimáticos. Los principales antioxidantes no enzimáticos en las plantas incluyen al ascorbato (vitamina C) y al glutatión, aunque el tocoferol (vitamina E), los flavonoides, los alcaloides y los carotenoides también pueden actuar como antioxidantes. Los mecanismos enzimáticos incluyen a la superóxido dismutasa, a las peroxidasas y a la catalasa (Bartels y Sunkar, 2005). Se ha mostrado que la sobreproducción de enzimas antioxidantes mejora la tolerancia al estrés oxidante en plantas transgénicas sometidas a estrés osmótico originado por sequía y salinidad. En plantas bajo condiciones de estrés salino las actividades de las enzimas antioxidantes, p.e la catalasa, la ascorbato peroxidasa, la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa, se incrementan, existiendo una correlación entre los niveles de estas enzimas y la tolerancia de las plantas a la salinidad. Así mismo, la habilidad de recuperación de las plantas después de su deshidratación correlaciona con la habilidad que tengan estas para mantener la síntesis de antioxidantes o para comenzar a sintetizarlos *de novo* (Parida y Das, 2005; Munns y Tester, 2008).

## **HALÓFITAS vs GLICÓFITAS**

El 98% de las plantas terrestres, incluyendo la mayoría de los cultivos agrícolas, tales como el arroz, el maíz, la soya, la cebolla, el frijol, el limón, el aguacate, entre otros, son

muy sensibles al estrés salino. El crecimiento y desarrollo de estas plantas se inhiben severamente e incluso algunos individuos se mueren bajo condiciones de entre 50-100 mM de NaCl en el suelo. A estas plantas que son muy sensibles a la salinidad se les denomina glicófitas. En la naturaleza también existen plantas tolerantes a la salinidad, tales como los manglares, algunas herbáceas (p.e. *Suaeda maritima*, *Salicornia europea* y *Mesembryanthemum crystallinum*), muy pocos cultivos agrícolas (p.e. cebada y algodón), entre otras, las cuales pueden crecer, desarrollarse y completar su ciclo de vida en suelos salinos con concentraciones alrededor de los 100 mM de NaCl o mayores (Orcutt y Nilsen, 2000; Zhu, 2001a). A estas plantas tolerantes a la salinidad se les denomina halófitas, y aunque representan solamente el 2% de las plantas terrestres, las halófitas se encuentran representadas en cerca de la mitad de las familias de las plantas superiores (Glenn y cols., 1999).

La tolerancia de las halófitas a la salinidad parece no estar conferida por la presencia de rutas metabólicas únicas que sean insensibles al  $\text{Na}^+$  o al  $\text{Cl}^-$ . Las enzimas citosólicas de las halófitas, tales como la malato deshidrogenasa y la glucosa-6-P deshidrogenasa, son tan sensibles como las enzimas de las glicófitas a concentraciones altas de NaCl (Greenway y Osmond, 1972). Generalmente tanto el  $\text{Na}^+$  como el  $\text{Cl}^-$  comienzan a inhibir a la mayoría de las enzimas cuando alcanzan concentraciones por arriba de los 100 mM (Munns, 2002). En lugar de lo anterior, las halófitas sobreviven y crecen en ambientes salinos debido a procesos de ajuste osmótico, los cuales involucran la compartimentalización de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la vacuola lítica y la exclusión de dichos iones tóxicos hacia estructuras especializadas, tales como glándulas y células vejiga, ausentes en las glicófitas. La mayoría de las glicófitas tienen una exclusión de sales muy pobre, por lo que permiten su acumulación a niveles tóxicos en las hojas. En las halófitas, el ajuste osmótico también se lleva a cabo mediante la acumulación de solutos orgánicos en el citosol y en el lumen, matriz o estroma de los organelos celulares, igual como ocurre en las glicófitas (Hasegawa y cols., 2000).

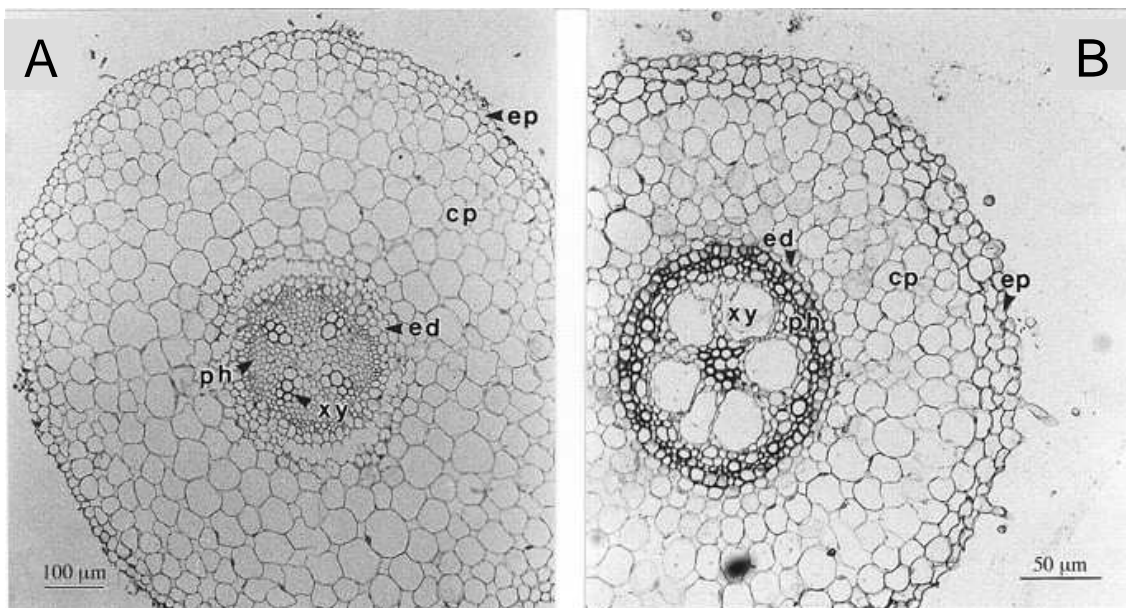
En respuesta a NaCl las glicófitas tienden a restringir la acumulación tóxica de los iones en la parte aérea de la planta mediante la regulación del influjo de iones en el xilema de las raíces; mientras que las halófitas hacen lo contrario, tienden a tomar y acumular el  $\text{Na}^+$  en la parte aérea de la planta, por lo que sus raíces tienen concentraciones de  $\text{Na}^+$  mucho más bajas que el resto de la planta (Hasegawa y cols., 2000; Munns, 2002). La habilidad de capturar y confinar a los iones  $\text{Na}^+$  en las hojas bajo condiciones salinas disminuye el potencial osmótico de la parte aérea de las halófitas, y por consiguiente, facilita el consumo y transporte del agua por las plantas, además de que reduce el coste metabólico que implica la producción de osmolitos al usar al  $\text{Na}^+$  como uno de ellos. Sin embargo, los beneficios osmóticos del almacenamiento y uso de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  como osmolitos abundantes y baratos energéticamente están limitados por la disponibilidad de espacio vacuolar. Por lo tanto, el crecimiento continuo de la planta, para asegurar la producción de vacuolas nuevas, puede ser un factor limitante en la tolerancia de las halófitas a la salinidad (Hasegawa y cols., 2000; Flowers y Colmer, 2008).

## CONSUMO Y TRANSPORTE DE AGUA POR LAS RAÍCES

Una de las funciones de las raíces es tomar el agua del suelo para suministrarla a la parte aérea de las plantas, esta función hace que la participación de las raíces sea esencial en el balance hídrico de las plantas. Aunque la mayor parte de la resistencia al flujo del agua a través de las plantas se debe al proceso de transpiración mediado por la apertura y el cerrado de los estomas, la anatomía de las raíces representa una barrera muy importante para el movimiento del agua y puede contribuir con hasta el 50% de la resistencia hidráulica de toda la planta (Martre y cols., 2001).

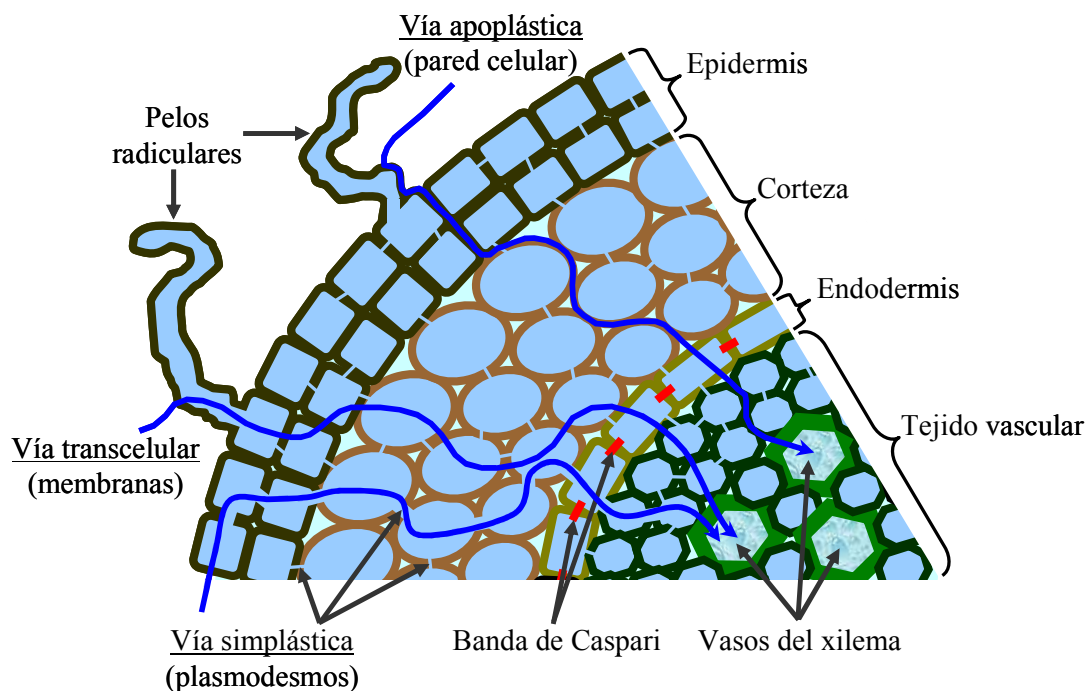
### Propiedades anatómicas e hidráulicas de las raíces

Para que el agua alcance los tejidos vasculares de las raíces tiene que fluir de manera radial a través de una serie de capas celulares concéntricas. Estas capas incluyen tejidos como la epidermis, la exodermis (en raíces en las cuales está diferenciada), la corteza, la endodermis, el periciclo, el xilema parenquimatoso y finalmente los vasos conductores del xilema (Fig. 1; Steudle y Peterson, 1998; Javot y Maurel, 2002).



**Figura 1. Organización tisular en las raíces de soya (A) y maíz (B).** Cortes transversales de raíces de plantas cultivadas en hidroponía por 18 (soya) y 10 (maíz) días tomados a 55 mm y 25 mm de la punta, respectivamente. Las fotografías ilustran la organización típica de las raíces en capas celulares concéntricas y muestran las diferencias entre las dicotiledóneas (soya) y las monocotiledóneas (maíz). ep, epidermis; cp, parénquima cortical; ed, endodermis; xy, xilema; ph, floema. Tomada de Javot y Maurel, 2002.

En las raíces, al igual que en otros órganos de las plantas, coexisten tres vías para el transporte del agua: 1) a través de las paredes celulares (vía apoplástica), 2) a través de los plasmodesmos entre una célula y otra (vía simplástica), y 3) a través de las membranas celulares (Fig. 2, vía transcelular). Hasta el momento, no ha sido posible separar experimentalmente a la vía simplástica de la vía transcelular, y por tanto, a la contribución de ambas para el flujo del agua se denomina la vía célula-a-célula. Las paredes celulares de las células de la exodermis y de la endodermis poseen una estructura particular llamada banda de Caspari compuesta por depósitos de suberina y/o lignina. Debido al carácter hidrofóbico y a la densidad de dichos depósitos, la banda de Caspari representa un impedimento para el flujo apoplástico del agua y de solutos desde el suelo hacia los vasos conductores del xilema localizados en el interior de las raíces. La barrera formada por la banda de Caspari obliga al agua y a los solutos a fluir a través de la vía célula-a-célula. La suberización de la endodermis es más pronunciada en árboles que en especies herbáceas, y en concordancia, las raíces de los primeros son menos permeables al agua y a los solutos (Zimmermann y Steudle, 1998).



**Figura 2. Representación esquemática de las tres rutas involucradas en el transporte del agua a través de la raíz.** El agua se puede mover a través de las paredes celulares (vía apoplástica), a través de las membranas celulares (vía transcelular) y a través de los plasmodesmos (vía simplástica). El esquema muestra una sección triangular de un corte transversal de una raíz en la cual se identifican la banda de Caspari, los vasos del xilema y los diferentes tejidos (vascular, endodermis, corteza y epidermis) que componen a una raíz.



Una vez que ha alcanzado el xilema, el agua se mueve axialmente hacia las partes aéreas. El xilema está compuesto de células largas (traqueidas o vasos) que han perdido sus protoplastos y, por lo tanto, presentan una resistencia mínima al flujo del agua a través de ellas. Las traqueidas y vasos maduros tienen paredes gruesas lignificadas, sin embargo, presentan áreas sin lignificar en las cuales se forman hoyos que facilitan el movimiento del agua desde las células circundantes o hacia ellas. El desarrollo del xilema a lo largo de la raíz confiere diferencias en la resistencia al flujo del agua a través de las raíces. El xilema no se encuentra diferenciado en la punta de la raíz, y por tanto, esta región presenta una resistencia alta al flujo axial del agua. En contraste, la diferenciación y sucesivo aumento del diámetro del xilema reduce dramáticamente la resistencia al flujo axial del agua en las regiones más viejas de la raíz. Los tejidos vivos (células con sus protoplastos), esencialmente aquellos que forman las capas celulares concéntricas, presentan la mayor resistencia al flujo del agua hacia el interior de las raíces. Entre el 70% y el 90% de la resistencia radial al flujo del agua se debe a los tipos celulares externos a los vasos del xilema, mientras que la resistencia restante se debe a la transferencia de agua a través de los hoyos de las paredes sin lignificar de las traqueidas y vasos maduros (Steudle y Peterson, 1998).

### **Fuerzas conductoras del movimiento del agua en las raíces**

En las plantas, como en otros organismos, el agua se mueve pasivamente en respuesta a gradientes en el potencial hídrico entre dos regiones. Cuando una planta transpira, la evaporación del agua en la cámara de los estomas tiene como resultado la generación de presiones altamente negativas (p.e. tensiones hasta de -1.0 MPa) en los vasos del xilema, lo que jala o arrastra al agua desde las raíces hacia la parte aérea de la planta. En la ausencia de transpiración, situación que ocurre cuando los estomas se cierran durante la noche o bajo condiciones de estrés hídrico, el movimiento del agua residual del suelo está dirigido por el bombeo activo de solutos hacia las raíces. La deposición de solutos crea una fuerza osmótica conductora que genera una presión hidrostática positiva en la raíz, la cual empuja a la savia axialmente en el xilema (Steudle, 2001).

La existencia de las vías apoplástica y célula-a-célula son el fundamento para el modelo compuesto del transporte de agua en las raíces (Steudle y Peterson, 1998; Steudle, 2000). De acuerdo con este modelo, el apoplasto no puede dar origen a fuerzas conductoras osmóticas debido a su falta de selectividad entre el transporte de agua y el de solutos, por lo que el transporte de agua a través de la vía apoplástica está dirigido esencialmente por fuerzas hidrostáticas (p.e. presiones o tensiones). Por el contrario, las membranas celulares permiten el establecimiento y mantenimiento de gradientes osmóticos a través de la vía célula-a-célula, los cuales, junto con las fuerzas hidrostáticas dirigen en conjunto el flujo del agua a través de las raíces (Steudle, 2000).

## **Cambios en las propiedades hidráulicas de las raíces bajo condiciones de salinidad y sequía**

Las plantas pueden modificar el flujo del agua a través de las rutas apoplástica y célula-a-célula para ajustar la conductividad hidráulica ( $L_p$ ) o permeabilidad al agua de las raíces en respuesta a estreses ambientales. Las variaciones en las propiedades de transporte del agua en las raíces se deben a cambios en los mecanismos que permiten el flujo del agua a través de la vía célula-a-célula y/o a alteraciones metabólicas y anatómicas profundas que afectan principalmente el flujo apoplástico del agua.

La exposición de las plantas a la salinidad de los suelos y a la sequía reduce, por lo general, la conductividad hidráulica de las raíces (Steudle y Peterson, 1998; Javot y Maurel, 2002). La disminución de la conductividad hidráulica de las raíces es una respuesta común a los estreses ambientales, y se podría deber a la baja demanda de agua y al crecimiento reducido de la parte aérea bajo condiciones estresantes. Además, en el caso de la sequía, la suberización y la lignificación de las paredes celulares, así como la diferenciación de la banda de Caspari en la exodermis, afectan el flujo apoplástico del agua a través de las raíces (Zimmermann y Steudle, 1998). En cuanto a la modificación del transporte del agua en las raíces por la vía célula-a-célula, esta se puede llevar a cabo mediante la regulación de la actividad y/o abundancia de las acuaporinas, proteínas que actúan como canales para el transporte del agua localizadas en las membranas de las células (Javot y Maurel, 2002; Maurel y *cols.*, 2008).

## **ACUAPORINAS**

Las acuaporinas (AQPs, del inglés aquaporins) pertenecen a la familia de proteínas intrínsecas de membrana (MIPs, del inglés major intrinsic proteins), la cual se encuentra conservada en animales, microorganismos y plantas, y está compuesta por proteínas integrales, con pesos moleculares entre los 25 y 34 kDa, las cuales facilitan la transferencia bidireccional de agua y de solutos neutros pequeños a través de las membranas celulares (King y *cols.*, 2004; Maurel y *cols.*, 2008). Originalmente, en las plantas el término AQP se refería de manera particular a las MIPs que transportaban agua, sin embargo, dada la versatilidad en las propiedades de transporte de muchas de ellas, el término AQP se usa ahora en un sentido más amplio, haciendo referencia a todas las MIPs de las plantas como AQPs.

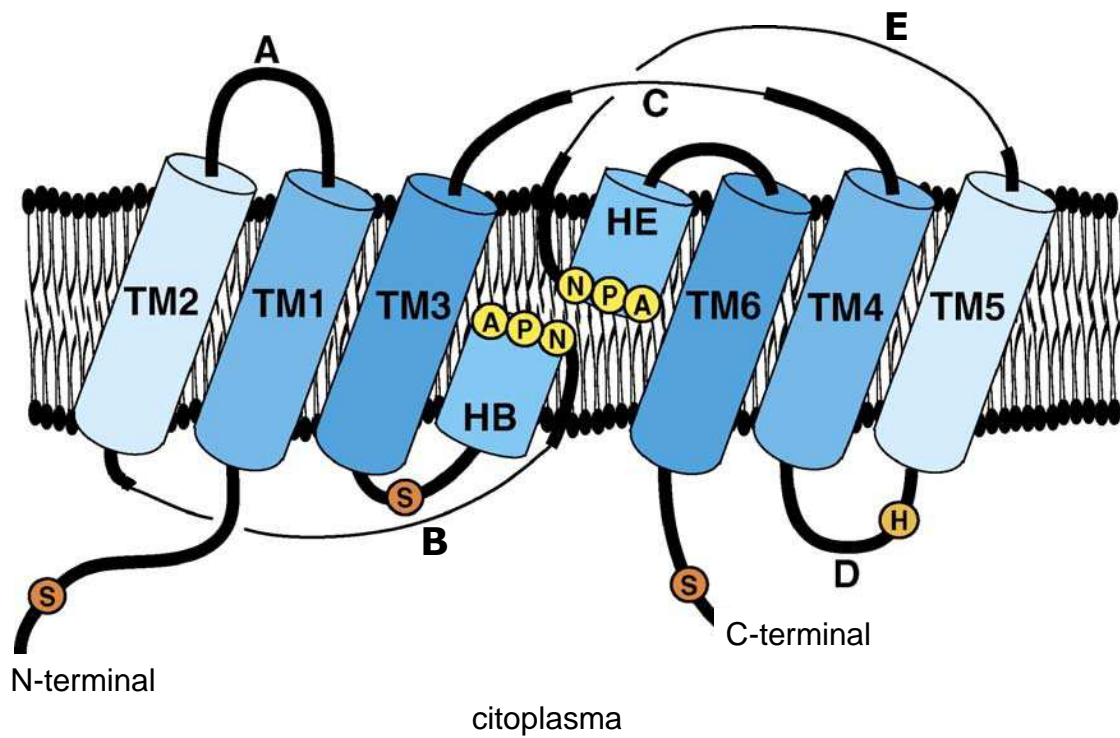
### **Estructura y selectividad de transporte de las acuaporinas**

La determinación de las estructuras atómicas de AQPs de microorganismos, animales y plantas, mediante cristalografía de rayos X, muestra características estructurales altamente conservadas en esta familia de proteínas integrales de membrana. Estructuralmente, las AQPs están compuestas por seis dominios de hélices  $\alpha$  transmembranales enlazados entre sí por cinco asas (A-E) localizadas en el espacio

intracelular (asas B y D) o extracelular (asas A, C y E; Fig. 3). Los extremos N- y C-terminales se encuentran expuestos en el lado citoplásmico de la membrana. El poro acuoso central está delineado por los dominios transmembranales y por las asas B y E, las cuales presentan dominios helicoidales cortos que penetran en la membrana para dar forma a la configuración de “reloj de arena” del poro (Figs. 4A y 4C; Johansson y cols., 2000; Tyerman y cols., 1999; Tyerman y cols., 2002). Cada uno de los dominios helicoidales de las asas B y E contiene un motivo de tres aminoácidos, asparagina-prolina-alanina (NPA), característico de las AQPs y que en conjunto forman un filtro de selectividad en el centro del poro. Los motivos NPA son muy conservados, sin embargo, se han encontrado excepciones en algunas NIPs y SIPs de maíz y *A. thaliana*, en las cuales el residuo de alanina se encuentra reemplazado por residuos de leucina, valina, serina, treonina o cisteína (Chaumont y cols., 2005).

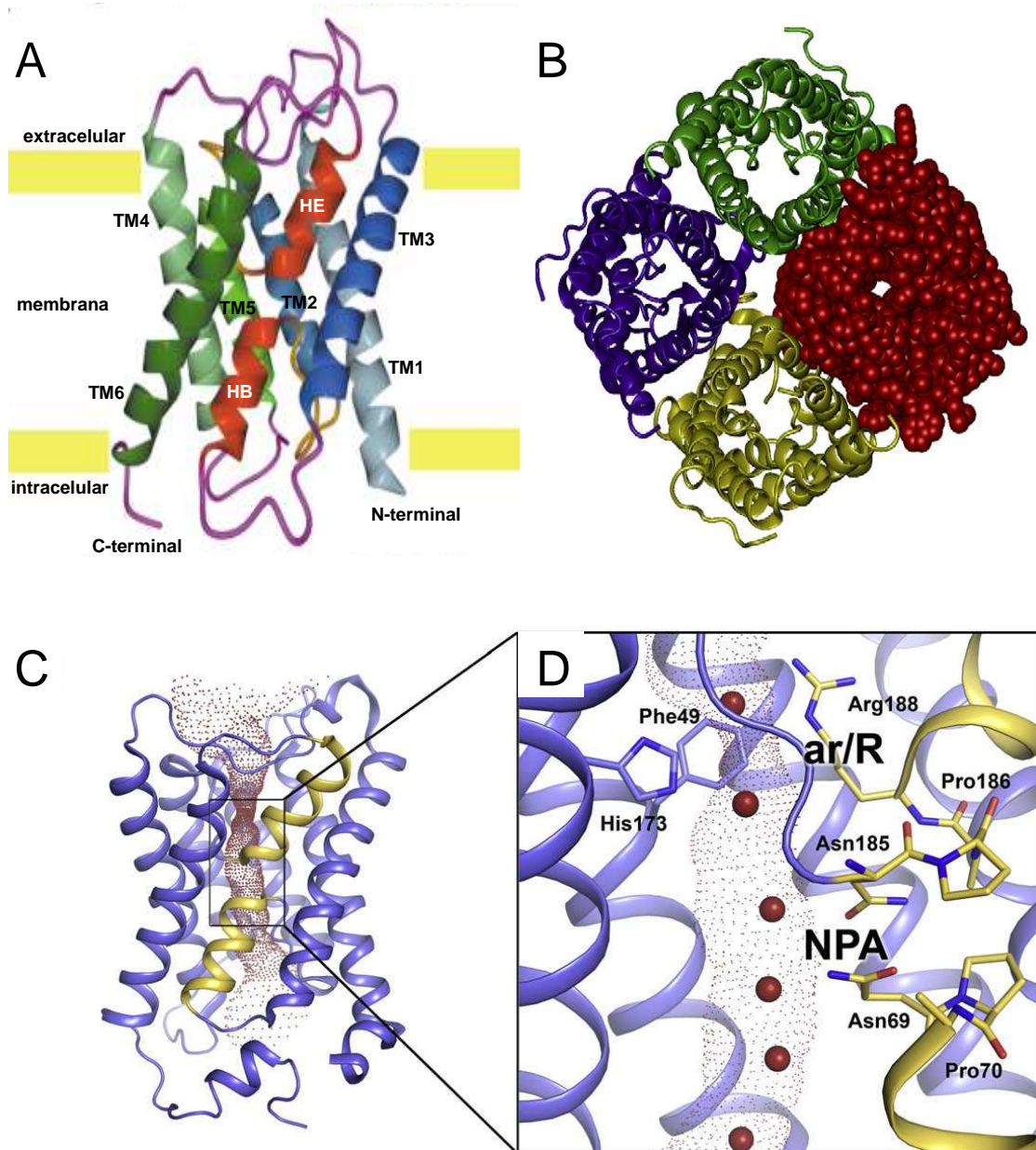
Las proyecciones estructurales determinadas por microscopía crioelectrónica y confirmadas por rayos X muestran que las AQPs de plantas, al igual que las AQPs de los microorganismos y animales, se encuentran presentes en las membranas como tetrámeros, en los cuales cada monómero forma un canal de agua independiente (Fig. 4B). El análisis de la estructura molecular de las AQPs PvTIP3;1 de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y SoPIP2;1 de espinaca (*Spinacia oleracea*) confirmó la conformación tetramérica típica encontrada en AQPs de bacterias y animales (Daniels y cols., 1999; Fotiadis y cols., 2001). El ensamblaje tetramérico de las AQPs puede ser importante para su plegamiento correcto así como para su estabilidad y/o transporte hacia las membranas de destino.

De acuerdo con las estructuras cristalográficas y con simulaciones moleculares dinámicas, la selectividad del sustrato (agua y/o solutos neutros pequeños como el glicerol y la urea) que pasa a través del canal o poro de las AQPs está conferida por varios mecanismos. Uno de ellos es la exclusión del sustrato por tamaño en la constricción física más estrecha del poro, la región aromático/arginina (ar/R), localizada en el vestíbulo extracelular y compuesta por una arginina y tres aminoácidos adicionales, uno de los cuales es aromático (Figs. 4C, 4D y 5). Otro mecanismo es el reconocimiento estereo-específico del sustrato mediado por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno definidos espacialmente dentro del poro. Así mismo, la impermeabilidad remarcada de las AQPs hacia los protones se debe a mecanismos de repulsión electrostática así como a la orientación dipolo y al aislamiento temporal de la molécula de agua en la región NPA conforme ésta avanza en la fila de moléculas que atraviesa el poro (Fig. 5, Gonen y Walz, 2006; Andrews y cols., 2008).



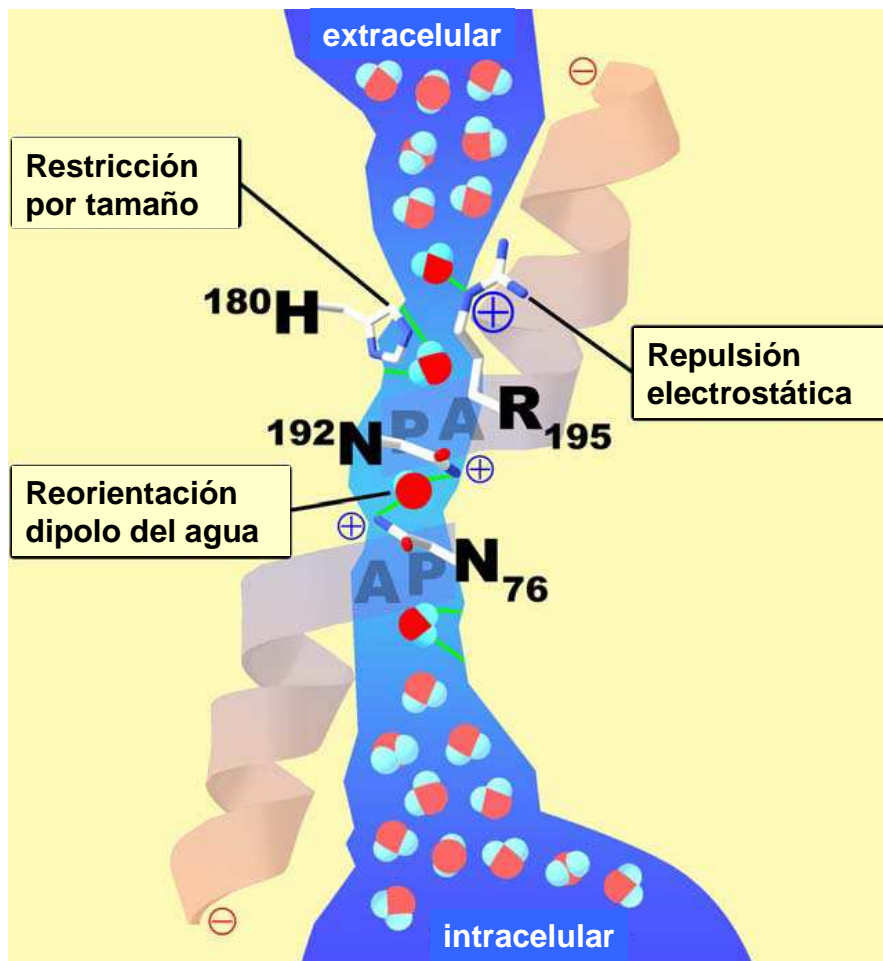
**Figura 3. Modelo de una acuaporina mostrando sus características principales.**

Los seis dominios de hélices  $\alpha$  transmembranales (TM1-TM6) están conectados por seis asas (A-E). Los dominios helicoidales (HB y HE) de las asas B y E, los cuales contienen a los motivos NPA altamente conservados en las acuaporinas, se introducen en la membrana y participan en la formación del poro acuoso. En el modelo se muestran los residuos de serina (S) e histidina (H) involucrados en la regulación de la actividad de las acuaporinas por fosforilación y pH, respectivamente. Modificada de Hachez y cols., 2006.



**Figura 4. Características estructurales conservadas en la familia de las acuaporinas.**

**A**, plegamiento común de un monómero de acuaporina (AQP1 de humano) inmerso en una membrana. Se muestra el plegamiento adoptado por los seis dominios transmembranales (TM1-TM6) y por los dominios helicoidales de las asas B (HB) y E (HE). Adaptada de Fujiyoshi, 2002. **B**, organización tetramérica conservada en las acuaporinas (SoPIP2;1 de espinaca). Vista desde el espacio extracelular. En el monómero mostrado como esferas de van der Waals se muestra el orificio del poro. Adaptada de Maurel, 2007. **C**, modelo del poro o canal que atraviesa a las acuaporinas (AQP5 de humano). La configuración de "reloj de arena" del poro está delineada por puntos densos de color púrpura. Los dominios transmembranales están coloreados en azul y los dominios helicoidales de las asas B y E están coloreados en amarillo. **D**, acercamiento del recuadro mostrado en C. Se muestra la localización de las regiones ar/R y NPA conservadas en las acuaporinas. Las moléculas de agua están representadas por esferas de color rojo. Modificada de Törnroth-Horsefield y cols., 2010.



**Figura 5. Esquema funcional para el paso del agua a través de las acuaporinas.** La forma del poro acuoso está representada en color azul y está basada en la estructura de la AQP1 de humano. Los vestíbulos extracelular e intracelular del canal están conectados por una región de 20 Å de largo que atraviesa la membrana a través de la cual las moléculas de agua pasan en una sola fila. Se muestran las interacciones temporales (líneas verdes) de cuatro moléculas de agua (mostradas en rojo intenso) con residuos localizados en el poro. Tres características del canal especifican la selectividad para el agua: 1) Restricción por tamaño. En la región ar/R localizada 8 Å por arriba del punto medio (región NPA) del canal el poro se estrecha a un diámetro de alrededor de 3.0 Å (un poco mayor al diámetro de 2.8 Å de una molécula de agua). 2) Repulsión electrostática. Los residuos de arginina (R195) e histidina (H180) de la región ar/R proporcionan cargas positivas fijas que repelen el paso de cationes, incluyendo al agua protonada ( $H_3O^+$ ). 3) Reorientación dipolo del agua. Los dominios helicoidales de las asas B y E que contienen a los motivos NPA se internan y encuentran en el punto medio del canal dando origen a dos dipolos cargados positivamente debido a los cuales las moléculas de agua se reorientan al pasar por dicho punto. Una sola molécula de agua forma enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos de asparagina (N76 y N192) contenidos en los motivos NPA. La interrupción de la cadena de enlaces de hidrógeno en la fila de moléculas de agua que atraviesan el canal evita el paso de protones a través del poro. Modificada de Agre, 2006.

## La familia de las acuaporinas en las plantas

A diferencia de los animales (13 genes), los hongos (3 genes) y las bacterias (2 genes), las plantas tienen mayor cantidad de AQP's en su genoma. Se han identificado 35 genes en *Arabidopsis thaliana*, 36 en maíz (*Zea mays*), 33 en arroz (*Oryza sativa*), 37 en jitomate (*Solanum lycopersicum*), 55 en el álamo de California (*Populus trichocarpa*; Maurel y cols., 2008) y hasta el momento 14 en *Mesembryanthemum crystallinum* (Vera-Estrella y cols., 2000). La gran diversidad de AQP's en las plantas denota la importancia que cada una de ellas puede tener de manera específica durante las etapas de crecimiento y desarrollo, así como durante la respuesta de las plantas a estreses ambientales que provocan un déficit hídrico en ellas, tales como la sequía y la salinidad de los suelos.

Con base en su secuencia de aminoácidos, las AQP's de las plantas se clasifican en cuatro grupos: las proteínas integrales de membrana plasmática (PIP's), las cuales se pueden subdividir en dos subfamilias, PIP1 (con extremo N-terminal largo) y PIP2 (con extremo N-terminal corto); las proteínas integrales de tonoplasto (TIP's); las proteínas integrales parecidas a la nodulina 26 (NIP's), el primer miembro identificado de este grupo, localizado en la membrana peribacteroidal de los simbiosomas fijadores de nitrógeno presentes en nódulos de raíces de soya (*Glycine max*); y las proteínas integrales básicas pequeñas (SIP's), las cuales se localizan principalmente en el retículo endoplásmico (Johanson y cols., 2001; Quigley y cols., 2001; Ishikawa y cols., 2005). La clasificación como PIP's o TIP's sugiere que las AQP's se localizan en la membrana plasmática o en la membrana vacuolar (tonoplasto), respectivamente, sin embargo se ha mostrado que las PIP's y las TIP's también se pueden localizar en otras membranas celulares (Barkla y cols., 1999a; Kirch y cols., 2000; Vera-Estrella y cols., 2004). Aunado a lo anterior, en algunas especies de plantas se han identificado AQP's filogenéticamente distintas a los cuatro grupos mencionados, las cuales se han agrupado y clasificado como proteínas integrales híbridas (HIP's) y proteínas integrales X (XIP's). En el genoma del musgo *Physcomitrella patens* se han identificado una HIP y dos XIP's, mientras que en plantas como *Selaginella moellendorffii*, *Gossypium raimondii*, *Nicotiana benthamiana*, la parra (*Vitis vinifera*), la mandarina (*Citrus clementina*), el ricino (*Ricinus communis*), el jitomate y el álamo de California (*Populus trichocarpa*) se han identificado XIP's (Danielson y Johanson, 2008). Fuera de su identificación filogenética como HIP's o XIP's se desconoce la fisiología de estas AQP's.

## Funciones fisiológicas de las acuaporinas en las plantas

Mediante estudios de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* y en células de levadura se ha mostrado la permeabilidad al agua de las AQP's de las plantas así como también el transporte de solutos neutros pequeños como el glicerol, la urea, el metilamonio, el ácido bórico, el ácido silícico; el transporte de gases como el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), y el transporte de iones como el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), por algunas de ellas. Por otra parte, mediante el uso de protoplastos o de vesículas de membranas aisladas en combinación con inhibidores de la actividad de las AQP's, como son los compuestos de mercurio que oxidan y se unen a residuos de cisteína, se ha

mostrado que el transporte del agua a través del tonoplasto así como a través de las membranas plasmática y peribacteroidal está mediado por las AQPs (Maurel y cols., 2008). También se ha mostrado que la toma de agua por las raíces está mediada por las AQPs mediante el uso de compuestos mercuriales (Javot y Maurel, 2002).

Aunado a lo anterior, se ha mostrado que las AQPs se expresan, a nivel de transcrito y de proteína, en prácticamente todos los tejidos y órganos de las plantas. Así mismo, se ha reportado la inducción del transcrito y de la proteína de las AQPs en diferentes tejidos, órganos y especies de plantas, en respuesta a sequía y salinidad, encontrándose una expresión diferencial de los genes en respuesta a dichos estímulos (Kirch y cols., 2000; Maurel y cols., 2002). La caracterización funcional y la localización particular en membranas a través de las cuales ocurre o debe ocurrir un transporte intenso y dinámico de agua y/o de solutos, como en el caso de las células de la raíz, las células del xilema parenquimatoso, las células guarda, el polen y las semillas (Maurel y cols., 2008), sugieren que las AQPs participan, a nivel celular, en la regulación osmótica del citoplasma, y a nivel de toda la planta, en la toma de agua y de nutrientes por las raíces, en la carga de agua hacia y desde el xilema, en la fotosíntesis, en el crecimiento del tubo polínico y la germinación de las semillas, así como en la respuesta de las plantas a estreses ambientales como la sequía y la salinidad de los suelos.

Sin embargo, la evidencia directa de la función de las AQPs en las plantas deriva de la manipulación de la expresión de los genes que codifican para dichas proteínas mediante técnicas de sobre-expresión (fusiones traduccionales con promotores constitutivos o expresión heteróloga) y de silenciamiento génico (supresión con antisentidos o por inserciones de ADN-T o por ARNi). La manipulación génica de las AQPs ha mostrado cambios en procesos fisiológicos importantes para las plantas como son la toma de agua por las raíces, la velocidad de transpiración, la permeabilidad osmótica de las células, el crecimiento celular, la fotosíntesis, y de manera muy importante durante la recuperación de las plantas en respuesta a estrés hídrico (Chaumont y cols., 2005; Maurel y cols., 2008; Maurel y cols., 2009).

## REGULACIÓN DE LAS ACUAPORINAS

### Fosforilación

Las AQPs presentan varios sitios probables de fosforilación en su secuencia de aminoácidos, y en efecto, dicha modificación post-traducciona es comúnmente observada en estas proteínas. En las plantas, particularmente, se ha reportado la fosforilación *in vivo* o *in vitro*, mediante etiquetado radioactivo o espectrometría de masas, de residuos de serina en los extremos N- y C-terminales de las AQPs PvTIP3;1 (Ser<sup>7</sup>) de la semilla de frijol (Johnson y Chrispeels, 1992), SoPIP2;1 (Ser<sup>274</sup> y Ser<sup>277</sup>) de la hoja de espinaca (Johansson y cols., 1996), GmNod26 (Ser<sup>262</sup>) de la raíz de soya (*Glycine max*; Miao y cols., 1992; Weaver y Roberts, 1992), así como de varias PIP1s y PIP2s de maíz (Van Wilder y cols., 2008) y de algunas PIP2s de *A. thaliana* (Prak y cols., 2008).



El efecto que tiene la fosforilación sobre las AQPs se ha estudiado en el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis*. Mediante este sistema se ha mostrado que la actividad de la AQP PvTIP3;1 como canal de agua aumenta en presencia de AMP cíclico (AMPC), un estimulador de fosforilación por proteína cinasa A (PCA, Maurel y cols., 1995). De manera similar, la permeabilidad del agua a través de las AQPs SoPIP2;1 y GmNod26 se incrementa en presencia de ácido okadaico (AO), un inhibidor de fosfatasas y de forbol miristato acetato (FMA), un estimulador de fosforilación por proteína cinasa C (Guenther y cols., 2003; Johansson y cols., 1998). El uso de mutantes en los estudios mencionados reveló que los residuos Ser<sup>262</sup> de GmNod26, Ser<sup>115</sup> de SoPIP2;1, y Ser<sup>7</sup>, Ser<sup>23</sup> y Ser<sup>99</sup> de PvTIP3;1 son importantes, mas no indispensables, para la actividad de dichas AQPs como canales de agua. Por tanto, la fosforilación de las AQPs estimula su actividad como canales de agua.

Además de regular positivamente su actividad como canales de agua, la fosforilación de las AQPs de las plantas también podría ser un medio para regular su tráfico membranal intracelular, como se ha mostrado para la AQP2 y la AQP1 de mamífero. En las células principales de los ductos colectores del riñón, la hormona diurética vasopresina se une a un receptor de vasopresina acoplado a una adenilil ciclase, lo que provoca un aumento en los niveles intracelulares de AMPc y la consecuente activación de la PCA. Una vez activada, la PCA fosforila a la AQP2 (Ser<sup>256</sup>) localizada originalmente en vesículas intracelulares. Este evento de fosforilación dispara la fusión de las vesículas en las cuales se encuentra la AQP2 con la membrana plasmática apical, provocando un aumento en la permeabilidad osmótica del agua a través de dicha membrana (Fushimi y cols., 1997; Johansson y cols., 2000; Nielsen y cols., 1995). Un mecanismo similar existe para la AQP1, pero solo en algunos tipos celulares. En estas células, la hormona secretina estimula la fosforilación de la AQP1 por una PCA, seguida por el transporte de las vesículas que contienen a la AQP1 hacia la membrana plasmática (Marinelli y cols., 1997). En el caso de las plantas, se han realizado ensayos de inmunodetección en fracciones microsomales en combinación con el uso de inhibidores o activadores tanto de la PCA como de la adenilil ciclase que sugieren la participación de una vía de señalización dependiente de AMPc en la redistribución membranal de la AQP MtTIP1;2 de *M. crystallinum* en respuesta a estrés osmótico (Vera-Estrella y cols., 2004), lo que indica la participación de procesos de fosforilación en el tráfico vesicular de las AQPs de plantas en respuesta a estrés. Recientemente, mediante el uso de mutaciones puntuales, se ha mostrado que la fosforilación del residuo Ser<sup>283</sup> de la AQP AtPIP2;1 de *A. thaliana* es necesaria para que la proteína de dicha AQP salga del retículo endoplásmico y se dirija hacia la membrana plasmática (Prak y cols., 2008), lo que apoya la participación del proceso de fosforilación en el tráfico membranal de las AQPs.

## pH y Ca<sup>2+</sup>

La regulación de la permeabilidad al agua de las AQPs por la concentración de protones y/o cationes divalentes como el Ca<sup>2+</sup> se ha reportado para AQPs de mamífero, tales como la AQP0, la AQP3 y la AQP6, y para algunas PIPs de plantas (Chaumont y cols., 2005; Gerbeau y cols., 2002; Yasui y cols., 1999; Zeuthen y Klaerke, 1999). En el

caso de las plantas se ha reportado que la permeabilidad al agua de vesículas de membrana plasmática purificadas de células de raíz y de células en suspensión de *A. thaliana*, se reduce en presencia de un pH menor a 7 y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Gerbeau y cols., 2002; Tournaire-Roux y cols., 2003). Además, mediante expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis* se ha mostrado que las AQPs AtPIP2;1, AtPIP2;2, AtPIP2;3 y AtPIP1;2 de *A. thaliana* se cierran cuando el pH citosólico se disminuye de 7 a 6. El uso de mutaciones puntuales ha determinado que la His<sup>197</sup>, localizada en el asa intracelular D y conservada en todas las PIPs, es el principal residuo responsable de la apertura y cierre de la AQP AtPIP2;2 mediados por cambios en el pH. La substitución de la His<sup>197</sup> por una alanina reduce los efectos debidos a la acidificación del citosol (Tournaire-Roux y cols., 2003). La acidosis del citosol de las células vegetales es un proceso que ocurre en respuesta a una condición de anoxia o privación de oxígeno, como aquella originada de manera natural durante la inundación de los suelos, la cual tiene como resultado la disminución de la permeabilidad al agua de las células de la raíz (Tournaire-Roux y cols., 2003; Zhang y Tyerman, 1991), debida, probablemente, a la reducción de la actividad de las AQPs..

El análisis de los posibles mecanismos involucrados en la apertura y cierre de las AQPs en respuesta a cambios en el pH se ha llevado a cabo mediante simulaciones de dinámica molecular. Para esto se ha utilizado como modelo estructural a la AQP AtPIP2;2. Bajo condiciones de acidosis del citosol, los residuos de histidina expuestos hacia el citosol, tales como la His<sup>103</sup> (conservada en el poro de las MIPs), la His<sup>197</sup> y la His<sup>264</sup> (conservadas en las PIPs) se protonarían, y por consiguiente, tendrían una carga positiva. Particularmente, las simulaciones muestran que la estructura abierta del canal se obtiene cuando la His<sup>197</sup> se encuentra desprotonada. En el estado cerrado del canal, cuando la His<sup>197</sup> está protonada, el asa D ocluye el vestíbulo citoplásmico del poro. Se propone que los residuos básicos de lisina y arginina, así como la His<sup>197</sup> protonada, localizados en el asa D pueden interactuar con residuos ácidos, como el Asp<sup>28</sup>, del extremo N-terminal, y por tanto, dicha interacción puede estabilizar la posición del asa D en la entrada del poro para mantenerlo bloqueado y evitar el paso del agua (Chaumont y cols., 2005; Maurel y cols., 2008).

En respuesta a iones de  $\text{Ca}^{2+}$  también se ha observado una reducción en la permeabilidad al agua de vesículas de membrana plasmática purificadas de células en suspensión de *A. thaliana* (Tournaire-Roux y cols., 2003). Además del  $\text{Ca}^{2+}$ , se ha mostrado que los cationes divalentes  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  inhiben la permeabilidad al agua de la AQP AtPIP2;1 (Verdoucq y cols., 2008). Mediante el análisis de mutantes se ha confirmado que los procesos de abertura y cierre de las PIPs mediados por protones y cationes divalentes está basado en mecanismos moleculares comunes que involucran la estabilización del asa D en la entrada citoplásmica del canal. En particular, se ha mostrado que la interacción de los cationes divalentes con residuos de ácido aspártico y ácido glutámico localizados en el extremo N-terminal participa en el anclaje y estabilización del asa D en el vestíbulo citoplásmico del canal, para mantenerlo así en un estado cerrado (Tournaire-Roux y cols., 2003).

## Oligomerización

La actividad de las AQPs como canales de agua se puede regular por el estado oligomérico de sus proteínas. Por lo general, las AQPs se encuentran en las membranas celulares en forma de tetrámeros, dentro de los cuales los monómeros vecinos interactúan entre sí por medio de sus hélices  $\alpha$  transmembranales y de sus asas extra-membranales para estabilizar el tetrámero. El análisis estructural con alta resolución de los cristales de la AQP1 (Murata *y cols.*, 2000) de mamífero y de la AQP GlpF (Fu *y cols.*, 2000) de bacteria ha mostrado que dichas AQPs forman homotetrámeros.

En las plantas, se han encontrado varias isoformas de AQPs en forma de heterotetrámeros. Mediante experimentos de entre-cruzamiento se han detectado heterómeros de dos AQPs de tonoplasto (una de 25 kDa y otra de 26 kDa) en semillas de lenteja (*Lens culinaris*). La incubación de membranas enriquecidas de tonoplasto con reactivos entre-cruzadores como el glutaraldehído, el ditiobis-succinimidilpropionato y el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno, indujo la formación de dímeros, trímeros y tetrámeros compuestos por las proteínas de 25 kDa y 26 kDa (Harvengt *y cols.*, 2000). La heteromerización de las AQPs de membrana plasmática se ha inferido mediante estudios de co-expresión de PIP1s y PIP2s de maíz en ovocitos de *X. laevis*.

Por lo general, las PIP2s exhiben actividades altas como canales de agua cuando se expresan en ovocitos o en vesículas de levadura mientras que las PIP1s a menudo son inactivas o presentan una actividad como canales de agua muy baja (Chaumont *y cols.*, 2005). La co-expresión de *ZmPIP1;2* y de diferentes *ZmPIP2s* en ovocitos de *X. laevis* mostró un efecto cooperativo positivo en la actividad de las AQPs, debido probablemente a una mejor distribución de las proteínas hacia la membrana plasmática (Fetter *y cols.*, 2004). La interacción física entre *ZmPIP1;2* y las *ZmPIP2s*, demostrada por cromatografía de afinidad, tuvo como resultado el aumento de los niveles de *ZmPIP1;2* en la membrana plasmática de los ovocitos. Por otra parte, las isoformas *ZmPIP1;1* y *ZmPIP1;2* muestran una actividad muy pobre como canales de agua cuando se expresan individualmente en ovocitos de *X. laevis*, sin embargo, se observó que su actividad aumenta cuando ambas isoformas se co-expresan juntas. Así mismo, la co-expresión de *ZmPIP1;2* y *ZmPIP2;5* provocó un aumento en la actividad de los canales de agua, sin embargo, no se observó efecto cooperativo entre ambas isoformas (Fetter *y cols.*, 2004). Estos resultados indican que se requiere de la heteromerización de las *ZmPIP1s* para que dichas isoformas actúen como canales de agua funcionales.

La interacción física entre las isoformas PIP1s y PIP2s del maíz también se ha demostrado *in planta* (Zelazny *y cols.*, 2007). Los resultados de imágenes obtenidas por FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) en protoplastos vivos de maíz que co-expresaban a isoformas de PIP1s y de PIP2s indican que hay una interacción física directa entre dichas isoformas, muy probablemente por heterotetramerización, la cual apoya el modelo propuesto en ovocitos sobre la facilitación del tráfico de las PIP1s hacia la membrana plasmática.

## Tráfico membranar

Después de su síntesis en el retículo endoplásmico (RE), las PIPs se deben transportar a través de la ruta secretoria para alcanzar su destino final, la membrana plasmática. Estudios en levaduras y animales, y más recientemente en plantas, han mostrado que la salida de las proteínas de membrana del retículo endoplásmico está determinada, en parte, por motivos en su secuencia primaria formados por dos residuos ácidos separados por cualesquier otro residuo (D/E-X-D/E). Estos motivos diacídicos son reconocidos por el componente Sec24 del complejo COPII (*Coat Protein complex II*) para permitir el reclutamiento de las proteínas en vesículas que van a salir del RE (Maurel y cols., 2009). Algunas PIPs tienen varios motivos diacídicos posibles en su extremo N-terminal, y la funcionalidad de uno de ellos se demostró para las AQPs *ZmPIP2;4* y *ZmPIP2;5* de maíz mediante ensayos de expresión transitoria en protoplastos aislados de mesófilo de maíz (Zelazny y cols., 2009). Por otra parte, el extremo N-terminal citosólico de la AQP *AtPIP2;1* de *A. thaliana* contiene dos residuos, Lys<sup>3</sup> y Glu<sup>6</sup>, que pueden ser dimetilados y monometilados, respectivamente. Debido a que el residuo Glu<sup>6</sup> pertenece a un motivo diacídico posible (Asp<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Glu<sup>6</sup>), existe la posibilidad de que la modificación del residuo Glu<sup>6</sup> altere el reconocimiento de la AQP por Sec24, proporcionando, por tanto, una regulación fina de la funcionalidad de dicho motivo diacídico (Prak y cols., 2008). De manera interesante, se debe tomar en cuenta que aunque algunas AQPs, como la *ZmPIP2;1* de maíz, carecen de motivos diacídicos posibles, su tráfico hacia la membrana plasmática se lleva a cabo de manera apropiada (Zelazny y cols., 2009). Esto sugiere que probablemente otro tipo de señales podrían estar actuando en las AQPs carentes de motivos diacídicos para promover su salida del RE.

Mediante ensayos inmunocitoquímicos, de inmunodetección y de expresión de fusiones proteicas con proteínas fluorescentes, tales como la GFP (*Green Fluorescent Protein*), se ha localizado a la mayoría de las AQPs de las plantas principalmente en la membrana plasmática, en el tonoplasto y en la membrana peribacteroidal de los nódulos de raíz (Barkla y cols., 1999; Chaumont y cols., 2005; Daniels y cols., 1994; Kirch y cols., 2000; Reisen y cols., 2003; Robinson y cols., 1996). Sin embargo, la distribución celular de algunas AQPs es más compleja que su simple localización en alguna de las membranas mencionadas. En *A. thaliana* se han encontrado homólogos de las PIP1, proteínas integrales de membrana plasmática, en invaginaciones de la membrana plasmática llamadas plasmalemasomas, las cuales podrían facilitar el intercambio de agua entre el apoplasto y la vacuola (Robinson y cols., 1996). Las fusiones de las AQPs de maíz *ZmPIP1;2* y *ZmPIP2;5* con la GFP se detectan no sólo en la membrana plasmática, sino también en membranas intracelulares y en el compartimiento perinuclear (Chaumont y cols., 2000), sitios que probablemente corresponden a la ruta de transporte de éstas PIPs a través de la vía de secreción. La localización de algunas AQPs de *M. crystallinum* también revela un patrón de distribución complejo. La acuaporina *McPIP1;4* no se detecta en fracciones de membrana plasmática, pero sí se encuentra en el tonoplasto y en otras fracciones con vesículas de membrana de densidad intermedia. Además, aunque *McPIP2;1* se encuentra en la membrana plasmática, esta AQP también se co-localiza en fracciones con vesículas de tonoplasto (Kirch y cols., 2000).

Por lo tanto, la regulación del tráfico membranal de las AQPs representa un mecanismo muy útil para la modulación de la permeabilidad de las membranas celulares al agua, sobretodo en respuesta a condiciones ambientales adversas que afectan la disponibilidad del agua para las plantas.

## **Glicosilación**

La glicosilación es una modificación post-traduccional importante para el transporte e inserción adecuados de muchas proteínas de membrana. En el caso de las AQPs se han reportado formas glicosiladas de las AQPs de mamífero AQP1 y AQP2 (Chaumont y cols., 2005), y se ha determinado que la glicosilación de la AQP2 es importante para su salida del complejo de Golgi y su posterior distribución hacia la membrana plasmática (Hendriks y cols., 2004).

En las plantas, el estudio sobre los efectos del estrés osmótico sobre la localización de la AQP *McTIP1;2* reveló un mecanismo de regulación novedoso relacionado con la glicosilación (Vera-Estrella y cols., 2004). La inmunodetección de la AQP *McTIP1;2* en hojas y en células en suspensión de *M. crystallinum* reveló que dicha AQP se redistribuye intracelularmente, moviéndose desde fracciones de tonoplasto hacia otras fracciones endomembranales, en respuesta a estrés osmótico. De manera interesante, el estrés osmótico indujo la aparición de una isoforma de *McTIP1;2* más grande que corresponde al estado glicosilado de la proteína. Sin embargo, cuando las células en suspensión se trataron con tunicamicina, un compuesto inhibidor de la formación de enlaces N-glicosídicos entre proteínas y carbohidratos, la isoforma glicosilada desapareció y se bloqueó la relocalización de *McTIP1;2* dependiente del estrés osmótico. Estos resultados indican que el estado glicosilado de las AQPs puede ser importante para su redistribución intracelular.

## ANTECEDENTES

*Mesembryanthemum crystallinum* se ha utilizado como planta modelo para estudiar las adaptaciones metabólicas de las plantas a la salinidad y al estrés osmótico (Bohnert y cols., 1988; Adams y cols., 1998). Dicha planta es una halófito, es decir, puede crecer, desarrollarse y completar su ciclo de vida en suelos salinos y en suelos con bajas cantidades de agua. Entre los mecanismos de adaptación de *M. crystallinum* a la salinidad se tienen la síntesis de los solutos compatibles prolina, pinitol, ononitol e inositol, los cuales se propone que actúan como osmolitos para la regulación del volumen celular y/o como protectores de los componentes celulares, así como la estimulación de la actividad de las H<sup>+</sup>-ATPasas de la membrana plasmática y del tonoplasto para activar los mecanismos de transporte que retiran al Na<sup>+</sup> del citoplasma y lo incluyen en vacuolas y en células especializadas tipo “vejiga” para evitar los efectos tóxicos del ión (Barkla y cols., 1999b; Vera-Estrella y cols., 1999). Además de la regulación del contenido de sal en las células, la regulación tanto de la toma de agua por las raíces como del flujo del agua dentro de la planta, mediados por las AQPs, es fundamental para la supervivencia de la planta bajo las condiciones estresantes provocadas por la salinidad y la sequía.

En *M. crystallinum* se han identificado hasta el momento 14 genes de AQPs. Mediante ensayos tipo “Western blot” usando anticuerpos péptido-específicos se ha mostrado que tres de ellas, *McPIP1;4* (MipA), *McPIP1;2* (MipB) y *McTIP1;2* (MipF) se encuentran tanto en las hojas como en las raíces, mientras que *McPIP2;1* (MipC) se encuentra sólo en las raíces. A nivel celular, ensayos de inmunocitocalización sobre cortes transversales de la punta de las raíces (3 mm del meristemo) han mostrado que las AQPs tienen una distribución preferencial: *McTIP1;2* se localiza en todos los tipos celulares, *McPIP1;4* se localiza predominantemente en células asociadas al floema, *McPIP1;2* preferentemente en xilema parenquimatoso y *McPIP2;1* principalmente en la epidermis y endodermis (Kirch y cols., 2000). Un estudio más completo a lo largo del eje de crecimiento de la raíz proporcionaría evidencia de la distribución celular de las AQPs en los diferentes estadios de desarrollo del tejido vascular, lo que ayudaría a comprender mejor su función en dicho órgano.

En respuesta a sal (200 mM NaCl) se ha mostrado que los niveles de proteína de *McPIP1;4* y *McPIP1;2* no se alteran en ningún tejido, sin embargo, se observó una disminución de los niveles de proteína de *McTIP1;2* en las hojas y un aumento de los niveles de proteína de *McPIP2;1* en las raíces (Kirch y cols., 2000). Estos resultados indican que ocurre una regulación diferencial de los niveles de proteína de las diferentes AQPs de *M. crystallinum* bajo condiciones salinas.

## JUSTIFICACIÓN

La localización específica en las raíces de *M. crystallinum*, particularmente en la epidermis y en la endodermis, tejidos involucrados en la absorción del agua del suelo por las raíces, así como el aumento de sus niveles de proteína bajo condiciones salinas sugieren que *McPIP2;1* debe tener una función muy importante en dicho órgano. Con base en estos antecedentes se decidió estudiar con mayor detalle a *McPIP2;1* para determinar su función en la tolerancia de *M. crystallinum* a la salinidad y al estrés osmótico.

Se ha reportado que la salinidad y el estrés osmótico pueden regular de manera diferente los niveles de proteína de una misma AQP en las plantas. Como se menciona anteriormente, el estrés salino disminuye los niveles de proteína de *McTIP1;2* en las hojas de *M. crystallinum* (Kirch y cols., 2000), sin embargo, en respuesta a un estrés osmótico (200 mM manitol/sorbitol) se observó el efecto opuesto, se indujo un aumento de los niveles de proteína de dicha AQP (Vera-Estrella y cols., 2004), lo cual sugiere una discriminación por parte de la planta entre la percepción de un estrés iónico, producido por un aumento de sales, y un estrés meramente osmótico, producido por un aumento de solutos neutros. Probablemente diferentes mecanismos de transducción de señales están involucrados en la adaptación de la planta a cada uno de los tipos de estrés mencionados.

Aunado a lo anterior, Vera-Estrella y cols. (2004) descubrieron que *McTIP1;2* se redistribuye intracelularmente bajo condiciones de estrés osmótico. Mediante ensayos de inmunodetección e inmunofluorescencia en fracciones microsomales aisladas de hojas y en células en suspensión de *M. crystallinum*, respectivamente, Vera-Estrella y cols. (2004) mostraron que además de localizarse en el tonoplasto, *McTIP1;2* también se encontró en compartimientos vesiculares esféricos (endosomas) en el citoplasma de las células en respuesta a estrés osmótico. La redistribución membranal de *McTIP1;2* podría estar involucrada en la restauración y mantenimiento de la osmolaridad celular bajo condiciones de estrés osmótico. Estos resultados novedosos en células vegetales sugieren la existencia de mecanismos de tráfico vesicular que podrían estar involucrados en el recambio constitutivo de las AQPs, o en el intercambio de AQPs entre los diferentes compartimientos celulares en respuesta a estrés para regular la expresión de las AQPs en los sitios donde se requiere su participación. Mediante ensayos de inmunodetección en fracciones microsomales aisladas de raíces de *M. crystallinum* se ha mostrado que *McPIP2;1* se localiza en fracciones membranales compuestas tanto por membrana plasmática como por tonoplasto (Kirch y cols., 2000), por lo que su localización membranal precisa dentro de las células aún queda por determinarse. Por lo tanto, es necesario determinar de manera precisa la localización subcelular de *McPIP2;1* dentro de las células durante el desarrollo normal de la planta y bajo condiciones de estrés para poder comprender la función fisiológica que tiene dicha AQP en las raíces de *M. crystallinum*, así como para determinar si *McPIP2;1* también se encuentra regulada por tráfico vesicular bajo condiciones de estrés salino y osmótico.

Por otra parte, mediante ensayos de expresión heteróloga de las AQPs en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* se ha demostrado que *McPIP1;4*, *McPIP1;2* (Yamada y cols., 1995) y *McTIP1;2* (Vera-Estrella y cols., 2004) actúan como canales para el transporte de agua y que las AQPs *NtAQP1* (Biela y cols., 1999) y *NtTIPa* (Gerbeau y cols., 1999) de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transportan glicerol y urea, además de agua. El análisis de la estructura primaria de *McPIP2;1* muestra que la región de constricción ar/R de dicha AQP, la cual se propone que actúa como un filtro de selectividad dentro del canal, está formada por los residuos Phe<sup>89</sup>, His<sup>218</sup>, Thr<sup>227</sup> y Arg<sup>233</sup>, los cuales son característicos de AQPs ortodoxas o selectivas para el transporte de agua (Beitz y cols., 2006; Calamita y cols., 1995; Johansson y cols., 1998). Este análisis sugiere que *McPIP2;1* puede ser un canal selectivo para el transporte de agua, sin embargo, se desconocen las propiedades de transporte de esta AQP. Además, mediante el uso de agonistas o antagonistas, se ha mostrado que la fosforilación de las AQPs *PvTIP3;1* de frijol (Maurel y cols., 1995), *SoPIP2;1* de espinaca (Johansson y cols., 1998) y *GmNodulina26* de soya (Guenther y cols., 2003) aumenta su permeabilidad al agua indicando que el proceso de abertura de los canales de agua de las plantas está regulado positivamente por fosforilación. *McPIP2;1* tiene seis residuos de serina que se predicen como sitios posibles de fosforilación por proteínas cinasas A (PCA) y C (PCC), lo que sugiere que su actividad como canal de agua y/o de solutos puede estar regulada por fosforilación.

Además de influir en la permeabilidad al agua, la fosforilación de las AQPs también es importante para determinar su localización intracelular. Se ha mostrado que la fosforilación de la AQP2 (Fushimi y cols., 1997) y la AQP5 (Kosugi-Tanaka y cols., 2006) de mamífero estimula su transporte desde vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática. En el caso de las plantas, Vera-Estrella y cols. (2004) mostraron evidencia (mediante ensayos de inmunodetección en distintas fracciones microsomales y el uso de inhibidores o activadores tanto de la PCA como de la adenilil ciclasa) que sugiere la participación de una vía de señalización dependiente de AMPc en la redistribución membranal de la AQP *McTIP1;2* de *M. crystallinum* en respuesta a estrés osmótico, implicando la participación de procesos de fosforilación en el tráfico vesicular de las AQPs de plantas en respuesta al estrés. Estos resultados denotan la importancia del estudio de las regulaciones post-traduccionales de las AQPs para comprender mejor su función y distribución en las plantas, sobre todo, cuando éstas se someten a condiciones adversas como el estrés salino y el estrés osmótico.



## HIPÓTESIS

La acuaporina *McPIP2;1* es un canal para el transporte selectivo de agua a través de las membranas celulares cuya actividad se encuentra regulada positivamente por fosforilación.

La salinidad y el estrés osmótico regulan la cantidad y la distribución subcelular y celular de la acuaporina *McPIP2;1* en las raíces de *Mesembryanthemum crystallinum*.

## OBJETIVOS

### General:

Comprender la función de la acuaporina *McPIP2;1* en el proceso de tolerancia de *Mesembryanthemum crystallinum* a la salinidad y al estrés osmótico.

### Particulares:

- 1.- Comprobar la función de *McPIP2;1* como canal de agua y determinar si dicho canal es selectivo para el transporte de agua.
- 2.- Determinar si la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua está regulada por fosforilación.
- 3.- Definir la localización subcelular de *McPIP2;1* bajo condiciones normales de crecimiento y desarrollo, así como bajo condiciones de salinidad y estrés osmótico.
- 4.- Establecer la participación de procesos de fosforilación en la localización subcelular de *McPIP2;1* bajo condiciones normales de crecimiento y desarrollo, así como bajo condiciones de salinidad y estrés osmótico.
- 5.- Determinar la distribución celular de *McPIP2;1* a lo largo del eje de crecimiento de las raíces bajo condiciones normales de crecimiento y desarrollo, así como bajo condiciones de salinidad y estrés osmótico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*

Las regiones codificantes o ADN complementarios (ADNc) de las AQPs *McTIP1;2* y *McPIP2;1* (en sus formas silvestre y mutadas: *McPIP2;1-S123A*, *McPIP2;1-S123N*, *McPIP2;1-S123F*, *McPIP2;1-S282A*, *McPIP2;1-S282N*, *McPIP2;1-S282F* y *McPIP2;1-S123/282A*), se clonaron por separado en el vector de expresión en ovocitos pGEM-HE, el cual contiene una región promotora para la T7 ARN polimerasa y las regiones 5' y 3' no traducidas del gen de la  $\beta$ -globina de *X. laevis* para aumentar la expresión de los genes insertados. Las clonas de las AQPs *GlpF* y *AtNIP6;1* fueron obsequiadas por el Dr. Chaumont (Gustavsson y cols., 2005) y el Dr. Roberts (Wallace y Roberts, 2005), respectivamente. El ADN plasmídico de cada construcción se purificó por medio de lisis alcalina como se describe en Sambrook y cols. (1989) y se linearizó con las enzimas de restricción *Nhe* 1, para el caso de *McTIP1;2* y de las formas silvestre y mutadas de *McPIP2;1*, o *Xba* 1, para el caso de *GlpF* y *AtNIP6;1*, las cuales cortan inmediatamente abajo del inserto. Una vez linearizado, el ADN plasmídico se trató con proteinasa K (200  $\mu\text{g/ml}$ ) por 30 min a 50°C para eliminar contaminaciones residuales con RNAsas. Después de tratado, el ADN se extrajo con fenol/cloroformo (1:1) y se precipitó con etanol (1/10 de volumen de 3.0 M acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol) para resuspenderlo posteriormente en H<sub>2</sub>O libre de RNAsas tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1%. A partir del ADN plasmídico linearizado se sintetizó el ARN complementario (ARNc) de las regiones codificantes de las AQPs utilizando el kit T7 (para *McTIP1;2* y las formas silvestre y mutadas de *McPIP2;1*) o T3 (para *GlpF* y *AtNIP6;1*) mMMESSAGE mMACHINE de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ambion, EUA). El ARNc sintetizado se trató con DNasa por 15 min a 37°C para remover el templado de ADN. El ARNc se recuperó mediante precipitación con cloruro de litio o mediante extracción con fenol/cloroformo (1:1) y precipitación con etanol. Finalmente, el ARNc se resuspendió en H<sub>2</sub>O-DEPC para su cuantificación y almacenamiento a -30°C.

Los ovocitos se extrajeron quirúrgicamente del abdomen de las ranas *X. laevis* y se incubaron en solución OR-2 (2 mM KCl, 82.5 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5) iso-osmótica (200 mOsmol/Kg ajustados con manitol) sin calcio, con colagenasa tipo B (2 mg/ml) por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Se lavaron los ovocitos cuatro veces con solución OR-2 sin calcio y se dejaron incubando en dicha solución a 17°C por 6 h. Después, se retiró la capa folicular de cada ovocito individualmente utilizando pinzas finas bajo un microscopio estereoscópico (Nikon, México). Una vez defoliculados, los ovocitos se dejaron incubando a 17°C en solución salina de Barth (10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.33 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>) iso-osmótica (200 mOsmol/Kg ajustados con manitol) durante toda la noche. Al siguiente día, los ovocitos extraídos y defoliculados se micro-inyectaron con 46.0 nl de H<sub>2</sub>O-DEPC o del ARNc (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) correspondiente usando un inyector automático NANOJECT II (Drummond,

Broomall, PA). Los ovocitos micro-inyectados se dejaron incubando en solución de Barth iso-osmótica durante 4 o 5 días antes de realizar los ensayos de hinchamiento.

### **Consumo de solutos radiactivos por ovocitos de *Xenopus laevis***

Los ensayos de consumo de glicerol o urea marcados radiactivamente se llevaron a cabo entre 4 y 5 días después de la micro-inyección de los ovocitos siguiendo el método descrito por Wallace y cols. (2005) con algunas modificaciones. Grupos de cinco ovocitos se incubaron a temperatura ambiente en 0.5 ml de solución de Barth iso-osmótica con 100 mM de glicerol y 60  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]-glicerol (3.0 Ci/mmol, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), o con 100 mM de urea y 30  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]-urea (60.0 mCi/mmol, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Después de 10 min, los ovocitos se lavaron cinco veces con 5 ml de solución de Barth iso-osmótica fría (en hielo) con 200 mM de glicerol o urea. Los ovocitos se lisaron durante toda la noche en 2.0 ml de 2% SDS a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 5 ml de contador de centelleo líquido (ACS, Amersham, IL, USA) al lisado de los ovocitos y se cuantificó el consumo isotópico con un contador de centelleo (LS6500, Beckman Coulter, Fullerton, CA).

### **Mutagénesis puntual dirigida**

Los residuos Ser<sup>123</sup> o Ser<sup>282</sup>, o ambos, susceptibles a ser fosforilados en la AQP McPIP2;1, se mutaron por mutagénesis puntual dirigida (BioS & T, Québec, CA). Las mutaciones sencillas se hicieron reemplazando a la Ser<sup>123</sup> o a la Ser<sup>282</sup> con alanina, asparagina, o fenilalanina. La mutante doble se hizo mediante el reemplazo de ambos residuos, Ser<sup>123</sup> y Ser<sup>282</sup>, por alanina.

### **Ensayos de hinchamiento de los ovocitos de *Xenopus laevis***

Los ensayos de hinchamiento se realizaron mediante la transferencia individual de los ovocitos de una solución de Barth iso-osmótica (200 mOsmol/Kg) a una solución de Barth hipo-osmótica (100 mOsmol/Kg). Después de la transferencia, los cambios de volumen (hinchamiento) en el ovocito provocados por el choque hipo-osmótico, se video grabaron con una cámara de video a color Hitachi KP-D50 (Hitachi Denshi, Woodbury, NY) montada en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 300 (Nikon, México). Las imágenes se capturaron a intervalos de 10 s por 2 min y se digitalizaron con el software Image-Pro Plus (versión 4, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Los datos se analizaron como el cambio proporcional en volumen y se normalizaron con el volumen inicial a tiempo 0. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente. Para probar el efecto de los agonistas y antagonistas de la fosforilación, los ovocitos se incubaron por 30 min en solución de Barth iso-osmótica con 5  $\mu\text{M}$  de ácido okadaico (AO, Sigma-Aldrich, México) o 10 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (FMA, Sigma-Aldrich, México) o 0.1% dimetil sulfóxido (DMSO), o 40  $\mu\text{M}$  de 8-Bromoadenosina-3',5'-cíclica monofosfato (8-Br-AMPC, Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA) o 1  $\mu\text{M}$  del péptido

inhibidor de PCA 14-22, amida, permeable en la célula, miristoilado (PKA-14-22-Myr-GRTGRRNAI-NH<sub>2</sub>, Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA) o 100 µM del péptido inhibidor de PCC 20-28, permeable en la célula, miristoilado, (PKC-20-28-Myr-N-FARKGALRQ-NH<sub>2</sub>, Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA) antes de realizar los ensayos de hinchamiento.

## **Aislamiento de membranas de los ovocitos de *Xenopus laevis***

### Homogenado crudo

El homogenado crudo de los ovocitos se extrajo como se describe en Vera-Estrella y cols. 1999. Se homogenizaron treinta ovocitos en 500 ml de solución amortiguadora para la extracción de proteínas (250 mM manitol, 10% (p/v) glicerol, 10 mM Tris/MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico) pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT (ditiotreitól), 1 mM benzamidina, 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 5% (p/v) PVP (polivinilpirrolidona) insoluble) y se agitaron con vortex por 1 min. Se centrifugó el homogenado a 10,000 × g por 15 min en una centrífuga de mesa Beckman GS15R (Beckman, Mexico) para remover restos celulares. Las muestras se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -80°C para su uso posterior.

### Método estándar

El aislamiento de membranas de los ovocitos por el método estándar se hizo como se describe en Fetter y cols. (2004) con algunas modificaciones. Se homogenizaron veinte ovocitos en 500 µl de solución amortiguadora de fosfatos hipotónica (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), pH 7.6) fría (en hielo) con un pistilo. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Las proteínas de la yema junto con los restos celulares de los ovocitos se colectaron a 110 × g por 5 min. Se desechó la pastilla y se colectó el sobrenadante. Las membranas contenidas en el sobrenadante se colectaron a 20,800 × g por 30 min y se resuspendieron en 50 µl de solución amortiguadora de fosfatos hipotónica. Finalmente, las membranas aisladas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -80°C para su uso posterior.

### Cuentas de sílice

El aislamiento de las membranas de los ovocitos mediante el uso de cuentas de sílice se hizo como se describe en Kamsteeg y Deen, 2001. Se agitaron quince ovocitos en 1% sílice coloidal, ludox C1 (Sigma, México) en solución amortiguadora salina MES (MBS, 20 mM MES, 80 mM NaCl, pH 6.0) por 20 min a temperatura ambiente. Se lavaron los ovocitos tres veces con MBS y se agitaron en 0.1% ácido poliacrílico (Sigma, México) en MBS por 20 min a temperatura ambiente seguido de tres lavados con MBS. Posteriormente, la membrana plasmática se aisló a 4°C siguiendo el procedimiento descrito por Wall y Patel (1989). Se homogenizaron los ovocitos en 1.2 ml de HbA (20 mM Tris pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 80 mM

sacarosa, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina y pepstatina) y se centrifugaron por 20 s a 13.5 × g. Se removió 1 ml del sobrenadante y se agregó 1 ml de HbA. La centrifugación y el intercambio se repitieron dos veces a 13.5 × g, una vez a 24 × g y una vez a 38 × g. Después del último lavado, las membranas plasmáticas se colectaron mediante una centrifugación a 14 000 × g por 20 min. La pastilla de membranas se resuspendió en un volumen pequeño de HbA, se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se guardó a -80°C para su uso posterior.

### **Cuantificación de proteínas de membrana**

El contenido de proteínas en microsomas y membranas aisladas se determinó siguiendo el método colorimétrico descrito por Bradford (1976) con una modificación. Brevemente, las proteínas contenidas en los microsomas y en las membranas aisladas se solubilizaron mediante la adición de 0.5% (v/v) Tritón X-100 por 5 min antes de la adición del reactivo colorante concentrado (Bio-Rad, México). Las muestras de proteína tratadas con Tritón se llevaron a un volumen de 800 µl con H<sub>2</sub>O milliQ estéril y se les adicionaron 200 µl de colorante de Bradford. Las muestras teñidas se colocaron en celdas de plástico y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (GMBH, Hewlett-Packard, Alemania). Las mediciones obtenidas se extrapolaron con una curva estándar realizada con varias concentraciones de albúmina sérica bovina (ASB, diluciones a partir de 1 mg/ml) para determinar la concentración de proteínas en las muestras.

### **Ensayos enzimáticos con marcadores de membranas**

Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por espectrofotometría. La actividad de la fosfodiesterasa alcalina (FDE, marcadora de membrana plasmática) se midió como se describe en Warren y cols., 2005. Se agregaron 30 µg de proteína en 200 µl de solución de reacción amortiguadora (40 mM solución amortiguadora con carbonato pH 10.5, 0.1% (v/v) Tritón X-100, y 2 mM éster de timidina-5'-monofosfato-p-nitrofenol). Se incubaron las muestras a 37°C por 1 h y se paró la reacción mediante la adición de 200 µl de 10% ácido tricloroacético (TCA). Después de la adición de 1.5 ml de 2 M NaOH se leyó la absorbancia a 400 nm y se calcularon los valores correspondientes usando estándares de 0.25 mM p-nitrofenol en 5% TCA. Las actividades de citocromo c oxidasa (marcadora de mitocondria) y NADH citocromo c reductasa (marcadora de retículo endoplásmico) se midieron por reducción u oxidación del citocromo c, respectivamente, como se describe en Askerlund y cols. (1987). Los valores de actividad enzimática se calcularon usando el coeficiente de extinción del citocromo c con valor de 18.5 mM/cm a 550 nm.

### **Alineamientos y modelos estructurales de *McPIP2;1***

Los alineamientos de las secuencias de las AQPs *McPIP2;1*, *SoPIP2;1*, *ZmPIP2;1* y *PvTIP3;1* se hicieron utilizando la aplicación CLC Sequence Viewer (CLC bio). Los

modelos estructurales de *McPIP2;1* generados por homología de secuencias se generaron usando el servidor automatizado MODWEB (Pieper y cols., 2011). El software automatizado MODPIPE calculó los modelos comparativos basados en los mejores templados disponibles en el banco de datos de proteínas (PDB, Protein Data Bank). Los modelos resultantes se anotaron en la base de datos MODBASE. La evaluación del modelo se hizo por un criterio de valoración del modelo que depende de la compactación del modelo, de la identidad entre las secuencias en la relación secuencia/estructura, y de los valores estadísticos de energía Z (Melo y cols., 2002). Los modelos generados por homología deducidos del alineamiento de *McPIP2;1* con las conformaciones abierta (código PDB, 2B5F) o cerrada (código PDB, 1Z98) de *SoPIP2;1* se seleccionaron para realizar los análisis estructurales de *McPIP2;1*. Estos dos modelos comparativos resultantes presentaron una confiabilidad alta con una probabilidad de plegamiento correcto mayor al 95% de acuerdo con el puntaje de 1.0 otorgado a cada uno de los modelos por separado, el cual se obtuvo a partir de los potenciales estadísticos (Melo y cols., 2002). Posteriormente, el análisis y la edición de las estructuras tridimensionales de *McPIP2;1* se realizaron usando la aplicación Swiss-Pdb Viewer 4.0.1 (Guex y Peitsch, 1997).

## Análisis de datos

La permeabilidad osmótica del agua a través de la membrana plasmática de los ovocitos ( $P_f$ , cm/s) se calculó como se describe en Vera-Estrella y cols. (2004), tomando en cuenta el cambio en el volumen de los ovocitos relativo al cambio de osmolaridad del medio externo, utilizando la siguiente relación:

$$P_f = \frac{V_o(d [V/V_o]) / dt}{SV_w(\text{osm}_i - \text{osm}_o)}$$

Donde  $V_o$  es el volumen inicial del ovocito al tiempo cero,  $V/V_o$  es el volumen relativo,  $V_w$  es el volumen molar parcial del agua ( $18 \text{ cm}^3/\text{mol}$ ),  $S$  es el área de la superficie inicial del ovocito,  $\text{osm}_i$  es la osmolaridad dentro del ovocito, y  $\text{osm}_o$  es la osmolaridad del medio externo. Se usó el intervalo de tiempo de 0 s a 60 s para calcular la  $P_f$ . Todos los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  EE (error estándar). El significado estadístico se evaluó usando la prueba  $t$  de Student para la comparación entre pares de datos y el análisis de varianza para la comparación de varios grupos de datos. Un nivel de probabilidad de 0.01 (indicado por asteriscos, \*\*\*) se consideró como alto a nivel de significado estadístico. Todos los resultados se obtuvieron de al menos tres diferentes grupos experimentales de ovocitos.

## Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Mesembryanthemum crystallinum* se germinaron en charolas de germinación con suelo comercial (Metro-Mix 510, SUN GRO Horticulture, WA) mezclado (4:1 v/v) con agrolita (DicaMex, México) en un invernadero con irradiación y fotoperiodo natural mantenido a temperaturas entre 22°C y 26°C. Las plantas se

regaron diariamente con agua de la llave y una vez por semana con medio nutritivo de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938) diluido a la mitad (0.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 3 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 23  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 8.1  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 0.39  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.16  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.04  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Tres semanas después de germinadas, las plantas se transfirieron a recipientes opacos (1L, 10L o 20L) con solución nutritiva de Hoagland diluida a la mitad (cultivos hidropónicos) y aireación constante. Después de 2 semanas en hidroponía se trató a las plantas con 200 mM de NaCl por 7 días, o con 200 mM de manitol o 200 mM de sorbitol por 24 h.

### **Aislamiento de microsomas de las raíces de *Mesembryanthemum crystallinum***

Los microsomas de las raíces de *M. crystallinum* se aislaron como se describe en Kirch y cols. (2000). Las raíces (30 g) se homogenizaron en 300 ml de medio de homogenización (400 mM manitol, 10% [p/v] glicerol, 30 mM Tris, 5 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.5 mM BHT (hidroxitolueno butilado), 0.25 mM dibucaina, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM DTT, 1 mM benzamidina, 26 mM metabisulfito de K, 5% [p/v] PVP (polivinilpirrolidona)-10 soluble, ajustado a pH 8.0 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) frío (en hielo o a 4°C) con o sin 0.5% [p/v] ASB, con la ayuda de una licuadora de laboratorio (modelo 51BL30, Waring, Torrington, CT). Todos los pasos del procedimiento se llevaron a cabo a 4°C. El tejido homogenizado se filtró a través de dos capas de gasa y se centrifugó a 10,000  $\times g$  por 20 min usando una centrífuga de alta velocidad (modelo RC5C, Sorvall, Newtown, CT). Se descartó la pastilla y el sobrenadante se centrifugó a 100,000  $\times g$  por 50 min usando un rotor de ángulo fijo (modelo 55.2 Ti, Beckman Instruments, Fullerton, CA) en una ultracentrífuga (modelo L8-M, Beckman Instruments, CA). Se aspiró y desechó el sobrenadante, y la pastilla de microsomas se resuspendió en 5 ml de medio de suspensión (400 mM manitol, 10% [p/v] glicerol, 6 mM Tris/MES pH 8.0, y 2 mM DTT) con la ayuda de un homogenizador de vidrio de 10 ml para proceder de manera inmediata con la separación de microsomas mediante gradientes continuos de sacarosa. En el caso de la separación de los microsomas mediante electroforesis zonal de flujo libre, la pastilla de microsomas se resuspendió en 2 ml de medio de suspensión con la ayuda del homogenizador de vidrio. Una vez resuspendidos, los microsomas se repartieron en alícuotas de 1 ml, se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido y se guardaron a -80°C para su uso posterior.

### **Separación de microsomas mediante gradientes continuos (5%-46% [p/v]) de sacarosa**

Los microsomas aislados de raíces (homogenizadas en medio de homogenización con ASB) de *M. crystallinum* se colocaron sobre gradientes continuos (5%-46% [p/v]) de sacarosa y se centrifugaron a 100,000  $\times g$  por 3 h a 4°C usando un rotor de ángulo libre (modelo SW 28, Beckman Instruments, CA) en una ultracentrífuga (modelo L8-M, Beckman Instruments, CA). Se colectaron 32 fracciones (1 ml/fracción) a lo largo de todo el gradiente, se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido y se almacenaron a -80°C. La

concentración de sacarosa a lo largo del gradiente se midió usando un refractómetro (Zeiss, Jena, Alemania).

### **Separación de microsomas por electroforesis zonal de flujo libre**

Los microsomas aislados de raíces (homogenizadas en medio de homogenización con o sin ASB) de *M. crystallinum* se fraccionaron por electroforesis zonal de flujo libre (EZFL) usando el sistema BD FFE (BD Proteomics, Alemania). Previo al fraccionamiento, los microsomas se diluyeron (1:1) [v/v] en medio de separación (10 mM TEA (trietanolamina), 10 mM ácido acético, 2 mM KCl y 250 mM sacarosa) y se centrifugaron a 14,000 × *g* por 20 min a 4°C. El sobrenadante (3 mg/ml) se conservó y se le agregó 3 mM MgSO<sub>4</sub> y 3 mM Tris/ATP (pH 6.5) antes de inyectarse continuamente en la cámara de separación del sistema a través de la entrada de alimentación anódica de la muestra por medio de una bomba peristáltica con una velocidad de inyección de 1.2 ml/h. La cámara de separación del sistema se alimentaba continuamente con medio de separación a través de las entradas de alimentación 2 a 6, y con medio de estabilización (40 mM TEA, 40 mM ácido acético, 8 mM KCl y 180 mM sacarosa) a través de las entradas de alimentación 1 y 7. Las soluciones de electrolitos catódica y anódica estaban compuestas por 100 mM TEA, 100 mM ácido acético y 20 mM KCl y se ajustaron a pH 7.4 con NaOH. Se agregó 0.4% formaldehído a la solución anódica para evitar la pérdida de cloruro por oxidación anódica. El medio de separación también se utilizó como medio de contra flujo para las entradas de alimentación C1, C2 y C3. La EZFL se llevó a cabo de manera horizontal con un voltaje constante de 750 V (118 mA) y una velocidad de flujo y contra flujo de los medios en la cámara de separación del sistema de 250 ml/h. La temperatura de la cámara de separación se mantuvo a 5°C durante la inyección y separación de microsomas por medio de un flujo continuo de refrigerante, por debajo de la placa de vidrio de la cámara de separación, proveniente de un baño de agua circulante.

Después de fraccionarse en la cámara de separación del sistema de EZFL, las fracciones de microsomas se colectaron continuamente en placas con 96 pozos profundos (4 ml/pozo, Sunergia Medical, VA). Las fracciones provenientes de 7 corridas consecutivas se juntaron, y los microsomas colectados se concentraron por centrifugación a 100,000 × *g* por 50 min a 4°C en una ultracentrífuga (modelo L8-M, Beckman Instruments) con un rotor de ángulo fijo (modelo 55.2 Ti, Beckman). Las pastillas de microsomas se resuspendieron en 50 µl o 100 µl de solución de suspensión amortiguadora (250 mM manitol, 10% (p/v) glicerol, 10 mM Tris/MES pH 8.0, y 2 mM DTT), se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C para su uso posterior. La separación de los microsomas por EZFL se monitoreó mediante la colección de muestras en placas de 96 pozos (250 µl/pozo) a diferentes tiempos durante la corrida y la medición de proteína (a una densidad óptica de 280 nm) en dichas muestras utilizando un espectrofotómetro de barrido (Power Wave, Bio-Tek Instruments, VT).



## **Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con sulfato dodecilo de sodio (SDS) y detección inmunológica de proteínas inmovilizadas (*Western blotting*)**

Cincuenta  $\mu\text{g}$  de proteínas de membranas aisladas de ovocitos de *X. laevis* o 100  $\mu\text{g}$  de proteínas de microsomas aislados de raíces de *M. crystallinum* se precipitaron mediante la dilución (50:1) de las proteínas de membrana en etanol/acetona (1:1). La dilución se incubó inmediatamente a  $-30^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Las proteínas precipitadas se colectaron a  $13,000 \times g$  por 20 min. Las pastillas se secaron con aire y se resuspendieron en solución amortiguadora de Laemmli 1X con 2.5% SDS. Veinte  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana se calentaron a  $60^{\circ}\text{C}$  por 2 min antes de ser cargadas en un gel de poliacrilamida al 12.5% desnaturalizante (con 10% SDS). La separación de las proteínas mediante SDS-PAGE se llevó a cabo en solución amortiguadora de corrida (25 mM Tris/HCl pH 8.3, 250 mM glicina, 0.1% SDS) aplicando un voltaje de 200 V por 45 min. Una vez separadas en el gel, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) en solución de transferencia amortiguadora (48 mM Tris base, 39 mM glicina, 20% (v/v) metanol) aplicando un voltaje de 100 V por 1 h 15 min. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el colorante de proteínas Ponceau S (0.1% en 1% ácido acético) por 30 s después de la transferencia para verificar la carga y transferencia completa de las proteínas.

Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con TBS (100 mM Tris/HCl pH. 7.5, 150 mM NaCl) con 0.02% azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) y 5% de leche libre de grasas (Svelty, Nestle, México) por 2 h a temperatura ambiente. Las membranas de nitrocelulosa bloqueadas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-McPIP2;1 (1:500, HTI-BioProducts, Ramona, CA), el cual reconoce un péptido localizado en el asa C extracelular de la proteína; anti-P-ATPasa (AHA3), marcador de membrana plasmática (MP; dilución 1:1000); anti-V-PPasa (AVP1) o anti-McTIP1;2, marcadores de tonoplasto (TP; dilución 1:1000); anti-calreticulina, marcador de retículo endoplásmico (RE; dilución 1:1000); anti-BP80, marcador de complejo de Golgi y compartimientos prevacuolares (CPV; dilución 1:1000); anti-Pep12, marcador de CPV (dilución 1:1000); anti-Ser(F), reconoce serinas fosforiladas; anti-Thr(F), reconoce treoninas fosforiladas, o anti-Tyr(F), reconoce tirosinas fosforiladas, durante toda la noche a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti-Ser(F), anti-Thr(F) y anti-Tyr(F) se usaron a una dilución de 1:100. Las membranas de nitrocelulosa se lavaron tres veces por 10 min con TBS-T (0.1% Tween 20 en TBS) y se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo (McPIP2;1, McTIP1;2, V-PPasa (AVP1), P-ATPasa (AHA3), calreticulina, RGP1) o anti-ratón (BP80, Pep12, serina-F, treonina-F, tirosina-F) conjugados con la peroxidasa de rábano (1:3000, invitrogen, Carlsbad, CA) por 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas de nitrocelulosa tres veces con TBS-T, se llevo a cabo la inmunodetección de las proteínas correspondientes por quimioluminiscencia usando el sistema de análisis ECL Western Blotting (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

## Ensayos de fosforilación *in vitro* e inmunoprecipitación

Las membranas (30 µg de proteína) aisladas de ovocitos de *X. laevis* se incubaron en 100 µl de mezcla de reacción (24 mM Tris/MES, pH 6.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.55 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 µl de [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (10 µCi/µl)) por 45 min a temperatura ambiente. Los microsomas (30 µg de proteína) aislados de raíces de *M. crystallinum* se incubaron en 100 µl de medio de fosforilación (6 mM Tris/MES pH 6.5, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 2 mM DTT, 250 mM manitol, 10% [p/v] glicerol y 1 µl de [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (10 µCi/µl)). Después, las proteínas de membrana se solubilizaron con 400 µl de gel amortiguador NET (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 0.25% ASB y 0.02% NaN<sub>3</sub>) y se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-McPIP2;1 (dilución 1/500) con agitación por mecedora. Se agregaron 20 µl de proteína A-sefariosa CL-4B (Amersham Biosciences, Uppsala, UK) y se dejó incubar por 2 h más a 4°C. Las proteínas de membrana se colectaron a 12,000 × g por 20 s a 4°C. Después de dos lavados con el gel amortiguador NET, la pastilla de proteína se lavó con 10 mM Tris/HCl pH 7.5 y 0.1% Nonidet P-40, y se centrifugó a 12,000 × g por 20 s. La pastilla se resuspendió luego en 20 µl de 2.5% solución amortiguadora de carga Laemmli y se calentó a 95°C por 3 min. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron por 12.5% SDS-PAGE. El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie (2.5 g/L en 40% metanol y 7% ácido acético) por 30 min a temperatura ambiente con agitación constante y después se dejó destiñendo (40% metanol y 7% ácido acético) durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante. Una vez desteñado, el gel de poliacrilamida se secó al vacío por 3 h utilizando un secador de geles (modelo 583, BIORAD, México). La autoradiografía se llevó a cabo mediante la exposición del gel a una película Kodak X-OMAT a -80°C por 24 h y su posterior revelado.

## Inmunolocalización y microscopia confocal de barrido con láser

Las raíces de *M. crystallinum*, tanto de plantas control (sin tratamiento alguno) como de plantas tratadas con 200 mM NaCl por 7 días o con 200 mM manitol por 48 h, se cortaron con una navaja para obtener tres muestras de tejido (0.5 cm de largo) provenientes de regiones a 0.5 cm, 5.0 cm y 10.0 cm de la punta. Las muestras de tejido se sumergieron en solución estabilizadora (50 mM PIPES (ácido 1,4-piperazinodietanosulfónico) pH 6.9, ajustado con KOH, 5 mM EGTA, 2 mM MgSO<sub>4</sub>) con 100 µM MBS (éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida) y 0.1% Tritón X-100 (en solución estabilizadora) por 30 min a temperatura ambiente. La fijación, deshidratación, imbibición en resina y montaje de las muestras de tejido se realizaron como se describe en Estrada-Navarrete y cols. (2006) con algunas modificaciones. Las muestras de tejido se fijaron en solución estabilizadora con p-formaldehído al 4% durante 3 h. Se lavaron los tejidos con 15 ml de solución estabilizadora amortiguadora por 10 min e inmediatamente después se deshidrataron gradualmente con etanol al 10%, 20%, 30%, 50% y 70% con agitación constante en un disco giratorio. Se dejaron incubando en etanol al 70% durante toda la noche. Posteriormente se deshidrataron con etanol al 80% y 90% durante 30 min cada vez con agitación constante. Después, las muestras se colocaron en etanol al 100% con 5 mM DTT por 1 h con agitación

constante, repitiéndose una vez. La imbibición de los tejidos en metacrilato se llevó a cabo de manera gradual mediante su incubación en una secuencia (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4, v/v) consecutiva de soluciones de etanol (con 5 mM DTT)-metacrilato (4;1 (v/v) m-butil-metacrilato/metil-metacrilato (Sigma Aldrich) con 0.375% (p/v) de benzoina etil éter (Fluka Chemika, Buchs, Suiza)) por 1 h cada vez. Las muestras de tejido se depositaron y orientaron en cápsulas de gelatina (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, U.S.A.) con 100% metacrilato durante toda la noche con agitación constante y protegidas de la luz. Después se hicieron tres cambios de solución con metacrilato al 100% con agitación por 1 h cada vez. La polimerización de la resina se llevó a cabo en moldes para imbibición de hielo, bajo una lámpara de luz UV colocada a una distancia de 10 cm por encima de las muestras durante 12 h. Los tejidos embebidos se seccionaron en cortes de 10  $\mu\text{m}$  de espesor con la ayuda de un ultramicrotomo (Leica, Bensheim, Germany) para luego colocarlos encima de gotas de agua pequeñas dispersadas sobre varios portaobjetos (CORNING MEXICANA). Las secciones de tejido se adhirieron a la superficie de los portaobjetos por calentamiento durante 2 min hasta que el agua se evaporó completamente.

La remoción del metacrilato de las secciones de tejido se llevó a cabo con cuatro cambios de acetona al 100%, seguidos por una rehidratación gradual (80%, 60%, 40% y 20% de acetona en agua), por 15 min cada vez. Después, las secciones de tejido se lavaron 3 veces (10 min cada vez) con solución amortiguadora TBST y se dejaron bloqueando con leche desgrasada al 5% en TBST (se utilizó el sobrenadante obtenido después de centrifugar a 14,000  $\times g$  por 20 min para evitar la presencia de grumos) por 2 h a temperatura ambiente. Las secciones de tejido se incubaron después con el anticuerpo primario anti-McPIP2;1 diluido (1:100) en TBST con leche desgrasada al 5% y 0.02%  $\text{NaN}_3$  por 6 h a temperatura ambiente en cámaras húmedas. Se lavaron las secciones de tejido con TBST en tres ocasiones (10 min cada vez) y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente anti-conejo alexa fluor 488 diluido (1:500) en TBST con leche desgrasada al 5% durante toda la noche a 4°C en oscuridad. Se lavaron las secciones con TBST en tres ocasiones nuevamente, por 10 min cada vez. Finalmente, las muestras se montaron usando Citifluor (Ted Pella, Inc., Redding, CA, U.S.A.) como medio de inmersión y cubreobjetos (CORNING MEXICANA) para su posterior análisis por microscopia confocal.

Las imágenes de fluorescencia de los anticuerpos secundarios alexa fluor 488 en las secciones transversales de raíz se obtuvieron con un equipo meta confocal Zeiss LSM 510 montado en un microscopio invertido Axiovert 200 M con un objetivo Plan Neofluar 20X/0.50 Ph2 usando el software ALEM (Carl Zeiss, USA). La excitación se hizo a 488 nm usando un láser de Argón y un espejo dicróico de excitación dual HFT UV 488/543/633 nm con un filtro de emisión LP 505 nm para la detección. Se utilizaron los mismos parámetros de intensidad de láser (20%) y sensibilidad del fotomultiplicador para todas las muestras. Las imágenes digitales obtenidas se pseudo colorearon de verde (alexa fluor 488) usando el software LSM Image Examiner (Carl Zeiss USA) y se procesaron usando el software Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, U.S.A.). Las secciones de tejido incubadas con suero preinmune o solamente con el anticuerpo secundario alexa fluor 488 no mostraron fluorescencia significativa en el rango del verde para las calibraciones del microscopio confocal.

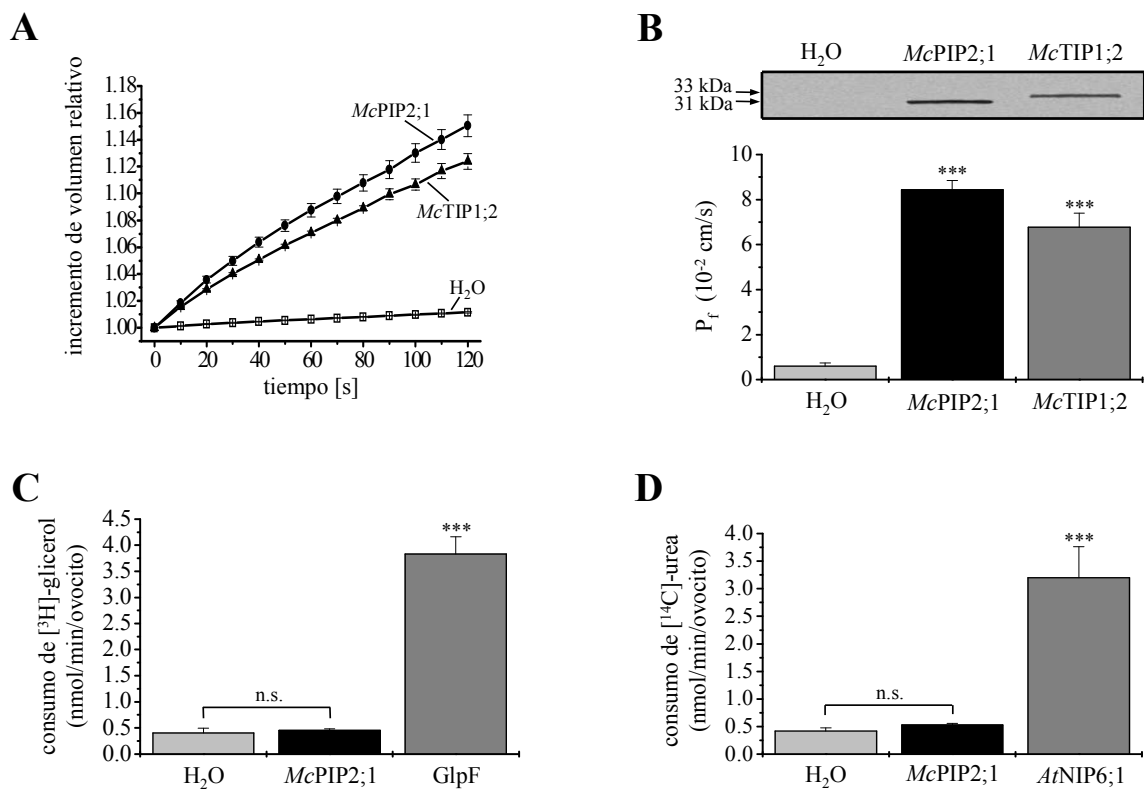
## RESULTADOS

### **McPIP2;1 es un canal de agua funcional**

Para comprobar la función de *McPIP2;1* como canal de agua se utilizó el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* como se describe en Vera-Estrella y cols. (2004). Los ARNc de las AQP *McPIP2;1* y *McTIP1;2* (control positivo) se microinyectaron por separado en los ovocitos, los cuales se sometieron posteriormente a un choque hipo-osmótico de 100 mosmol/Kg para analizar su hinchamiento con el tiempo y determinar la permeabilidad osmótica del agua ( $P_f$ ) a través de su membrana plasmática. El hinchamiento de los ovocitos se grabó con una videocámara montada en un microscopio invertido durante un tiempo máximo de 2 min para evitar la destrucción de las células. Los ovocitos microinyectados con *McPIP2;1* se hincharon un 15.1 % respecto de su volumen inicial en respuesta al choque hipo-osmótico impuesto (Fig. 6A) mientras que los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O libre de ribonucleasas (RNasas, tratada con dietil pirocarbonato, DEPC), los cuales se utilizaron como control negativo del experimento, no mostraron un cambio de volumen considerable (1.2 %, Fig. 6A,  $p < 0.01$  en comparación con los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1* o *McTIP1;2*). Como control positivo del experimento se utilizaron ovocitos que expresaron a la AQP *McTIP1;2* (Vera-Estrella y cols., 2004). Estos ovocitos exhibieron un incremento de volumen de 12.4 %, relativo a su volumen inicial (Fig. 6A), comparable al reportado previamente (Vera-Estrella y cols., 2004).

A partir de las velocidades iniciales (primeros 60 s) de hinchamiento de los ovocitos en respuesta al choque hipo-osmótico impuesto, se calculó la  $P_f$  a través de la membrana plasmática de dichas células como se describe en materiales y métodos. Los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1* mostraron una  $P_f$  de  $8.43 \times 10^{-2}$  cm/s, mientras que los ovocitos que expresaron a *McTIP1;2* exhibieron una  $P_f$  de  $6.77 \times 10^{-2}$  cm/s (Fig. 6B). Estos valores de  $P_f$  son 14 y 11 veces mayores, respectivamente, al valor de  $P_f$  ( $0.61 \times 10^{-2}$  cm/s) obtenido de los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O (Fig. 6B,  $p < 0.01$ ). Los valores de  $P_f$  de los dos grupos de ovocitos microinyectados con *McPIP2;1* o *McTIP1;2* son diferentes entre sí estadísticamente con una  $p < 0.01$ .

Para confirmar la expresión de *McPIP2;1* y de *McTIP1;2* en la membrana plasmática de los ovocitos microinyectados con las AQPs mencionadas se aislaron membranas de dichas células por tres métodos diferentes como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Como se muestra en la Tabla 1, mediante la determinación de actividades enzimáticas asociadas específicamente con la membrana plasmática (MP, fosfodiesterasa alcalina), con la mitocondria (citocromo c oxidasa) y con el retículo endoplásmico (RE, NADH citocromo c reductasa), demostramos que las membranas aisladas por el método estándar se encuentran enriquecidas principalmente con MP y presentan contaminaciones muy pequeñas de mitocondria y RE. Por estas razones, se decidió utilizar a dichas membranas para análisis posteriores, a las cuales se referirá como membranas de los ovocitos.



**Figura 6. Determinación de la actividad de *McPIP2;1* como un canal selectivo para el transporte de agua.** Expresión heteróloga de *McPIP2;1* en ovocitos de *Xenopus laevis*. **A**, hinchamiento de los ovocitos con el tiempo en respuesta a un choque hipo-osmótico. El incremento de volumen de los ovocitos, relativo a su volumen inicial (establecido como 1), se muestra en función del tiempo después de transferir los ovocitos de un medio iso-osmótico (200 mosmoles/Kg) a un medio hipo-osmótico (100 mosmoles/Kg). Los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O o *McTIP1;2* se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente (n=20). **B**, permeabilidad osmótica del agua (P<sub>f</sub>) a través de la membrana plasmática de los ovocitos que expresan a *McPIP2;1* o *McTIP1;2*. Los valores de P<sub>f</sub> se calcularon a partir de las velocidades iniciales (60 s) de hinchamiento de los ovocitos (datos mostrados en A) como se describe en materiales y métodos (n=20, \*\*\*, p<0.01 en comparación con los ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O). (Inserto) Inmunodetección de las proteínas *McPIP2;1* (31 kDa) y *McTIP1;2* (33 kDa) en membranas enriquecidas con membrana plasmática aisladas de los ovocitos que expresaron a dichas AQPs (resultados de tres experimentos independientes). **C** y **D**, ensayos de consumo de solutos radioactivos. Los ovocitos inyectados con *McPIP2;1*, GlpF (control positivo para el consumo de glicerol) o *AtNIP6;1* (control positivo para el consumo de urea) se incubaron por 10 min en una solución iso-osmótica (200 mosmoles/Kg) con [<sup>3</sup>H]-glicerol o [<sup>14</sup>C]-urea. Se utilizó un exceso de solutos no radioactivos para facilitar el consumo de los compuestos radioactivos por los ovocitos. Se muestran los resultados de tres grupos de ovocitos diferentes (n=15, \*\*\*, p<0.01 en comparación con los ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O). n.s., diferencias no significativas.

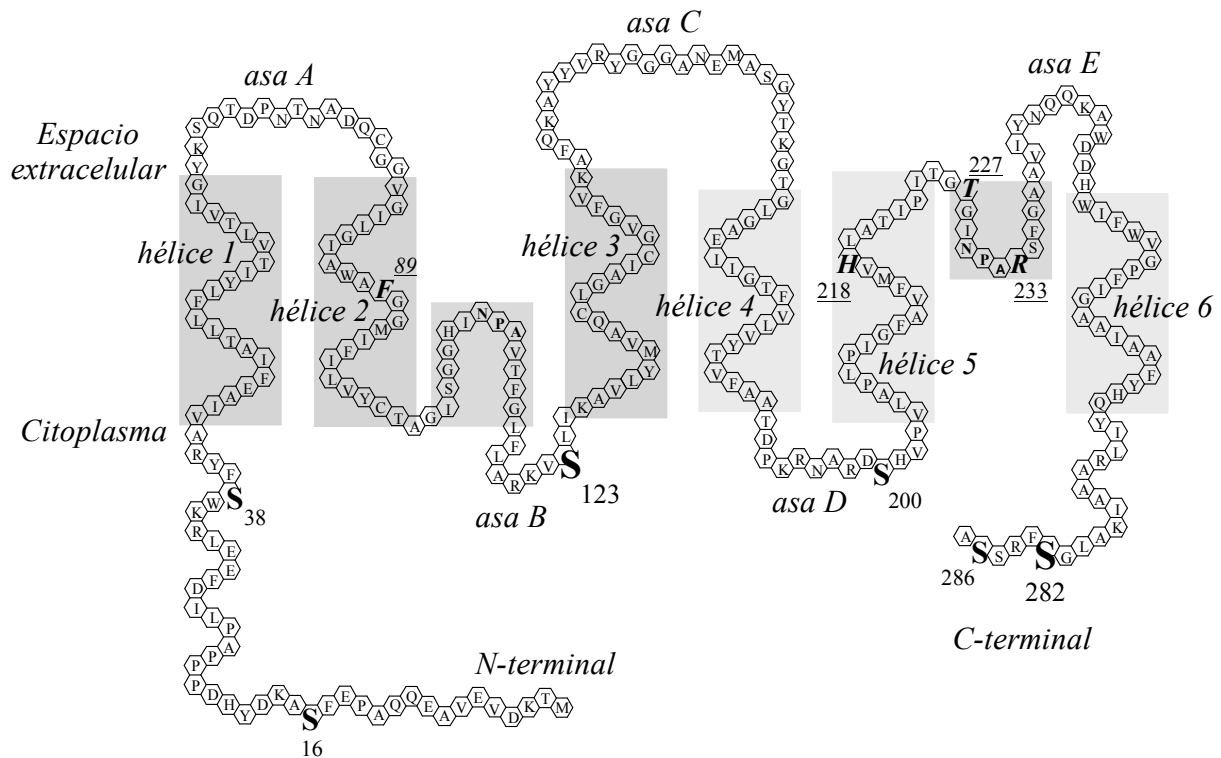
La detección de *McPIP2;1* y de *McTIP1;2* en las membranas de los ovocitos se realizó mediante ensayos tipo Western blot usando anticuerpos péptido-específicos para cada una de las AQPs (Kirch y cols., 2000; Vera-Estrella y cols., 2004). Como se muestra en el inserto de la Fig. 6B, los anticuerpos anti-*McPIP2;1* y anti-*McTIP1;2* reconocieron específicamente a polipéptidos de 31 kDa y 33 kDa, respectivamente, en las membranas de los ovocitos que expresaron a dichas AQPs. Ambos anticuerpos no reconocieron polipéptido alguno en las membranas de los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O (inserto, Fig. 6B). Por lo tanto, estos resultados muestran que tanto *McPIP2;1* como *McTIP1;2* se expresaron efectivamente en la membrana de los ovocitos, lo que explicaría los cambios en la P<sub>f</sub> mostrada a través de dichas membranas.

**Tabla 1. Actividades enzimáticas de marcadores de membrana en homogenizado crudo de ovocitos de *Xenopus laevis* y en membranas aisladas siguiendo el método estándar o el método de cuentas de sílice.** La extracción del homogenizado crudo y la separación de membranas de los ovocitos se hicieron como se describe en Materiales y Métodos. Los valores mostrados representan el promedio  $\pm$  DE de tres preparaciones de ovocitos diferentes.

Enzimas ensayadas	Homogenizado crudo	Membranas aisladas por método estándar	Membranas aisladas mediante cuentas de sílice
Actividad enzimática ( $\mu$ mol/mg proteína) (% respecto del homogenizado crudo)			
Fosfodiesterasa alcalina (membrana plasmática)	16.05 $\pm$ 0.7046 100 %	126.33 $\pm$ 2.44 787%	63.48 $\pm$ 2.66 395.5%
Citocromo c oxidasa (mitocondria)	0.838 $\pm$ 0.0143 100 %	0.00782 $\pm$ 0.0022 0.93%	0.0198 $\pm$ 0.0078 2.36%
NADH cit c reductasa (retículo endoplásmico)	0.2003 $\pm$ 0.0327 100%	0.0103 $\pm$ 0.0270 5.14%	0.0091 $\pm$ 0.075 4.54%

## **McPIP2;1 no transporta ni glicerol ni urea**

El análisis de la estructura primaria de *McPIP2;1* muestra que la región de constricción más estrecha dentro del poro del canal denominada ar/R (aromático/arginina), la cual actúa como un filtro de selectividad, está formada por los residuos Phe<sup>89</sup>, His<sup>218</sup>, Thr<sup>227</sup> y Arg<sup>233</sup> (Fig. 7), los cuales son característicos de AQPs que transportan solamente agua (Johansson y cols., 1998; Beitz y cols., 2006; Calamita y cols., 1995). Para confirmar la selectividad de transporte de *McPIP2;1* hacia el agua se utilizó el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis* y se llevaron a cabo ensayos de consumo de solutos radiactivos. Los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O (control negativo) o con las AQPs *McPIP2;1*, GlpF (control positivo para el transporte de glicerol) o *AfNIP6;1* (control positivo para el transporte de urea) se incubaron por 10 min en un medio iso-osmótico (200 mosmol/Kg) con [<sup>3</sup>H]-glicerol o [<sup>14</sup>C]-urea y un exceso de glicerol o urea no radiactivos, respectivamente, para inducir el consumo de los solutos radiactivos por los ovocitos a favor de su gradiente de concentración. Posteriormente se determinó la marca radiactiva dentro de los ovocitos mediante centelleo (ver Materiales y Métodos). Los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1* mostraron valores de consumo de glicerol (0.45 nmol/min/ovocito, Fig. 6C) y urea (0.53 nmol/min/ovocito, Fig. 6D) muy bajos, similares a los valores mostrados por los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O (0.40 y 0.42 nmol/min/ovocito de glicerol (Fig. 6C) y urea (Fig. 6D), respectivamente). Los ovocitos que expresaron a las AQPs GlpF y *AfNIP6;1*, usadas como controles positivos, mostraron valores altos de consumo de glicerol (3.83 nmol/min/ovocito, Fig. 6C) y urea (3.2 nmol/min/ovocito, Fig. 6D), respectivamente, en comparación con los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O ( $p < 0.01$ ). Los valores de consumo de solutos radiactivos obtenidos para los ovocitos microinyectados con GlpF y *AfNIP6;1* son similares a los valores reportados previamente para dichas AQPs (Gustavsson y cols., 2005; Wallace y Roberts, 2005). Estos resultados corroboraron que *McPIP2;1* no transporta ni glicerol ni urea, y por tanto, sugieren que *McPIP2;1* es un canal selectivo para el transporte de agua.



**Figura 7. Modelo topológico de un monómero de McPIP2;1.** Seis  $\alpha$ -hélices transmembrales se conectan entre sí por medio de cinco asas (A-E). Los extremos N- y C- terminales se localizan en el espacio citoplásmico. Los dominios hidrofóbicos helicoidales de las asas B y E con las firmas de aminoácidos NPA, conservadas en las AQPs, se introducen y se encuentran dentro de la membrana desde lados opuestos para crear el poro acuoso. Se muestran los residuos de serina (S) que se predice se fosforilan por PCA (Ser<sup>38</sup>, Ser<sup>123</sup>, Ser<sup>200</sup> y Ser<sup>286</sup>) o PCC (Ser<sup>16</sup>, Ser<sup>282</sup>). El residuo Ser<sup>16</sup> está conservado en algunas PIP1s y PIP2s. Los residuos Ser<sup>38</sup>, Ser<sup>123</sup> y Ser<sup>200</sup> están conservados en las PIPs. El residuo Ser<sup>282</sup> está conservado en las PIP2s. Los aminoácidos Phe<sup>89</sup>, His<sup>218</sup>, Thr<sup>227</sup> y Arg<sup>233</sup> forman la región de constricción aromático/arginina (ar/R) dentro del poro del canal.

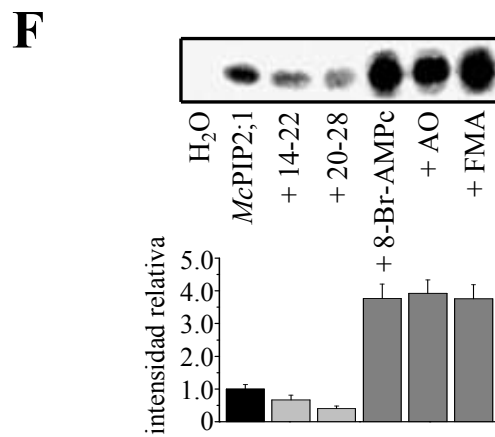
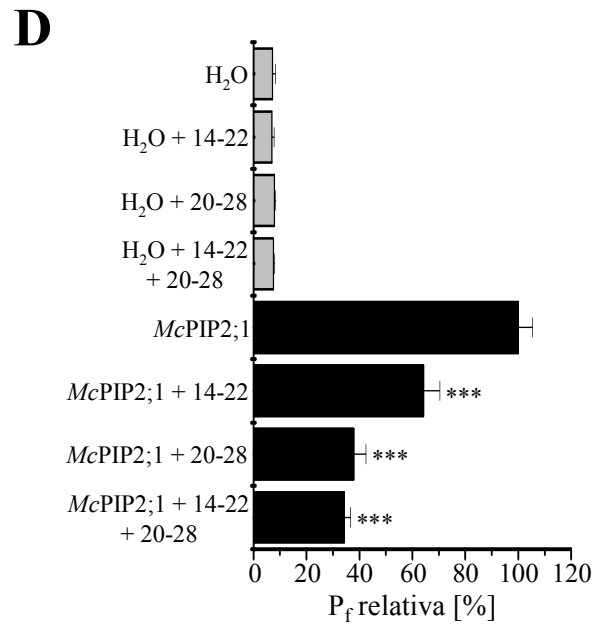
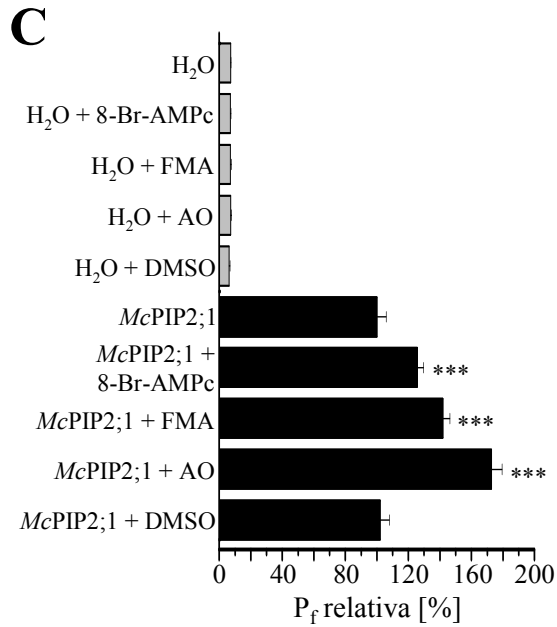
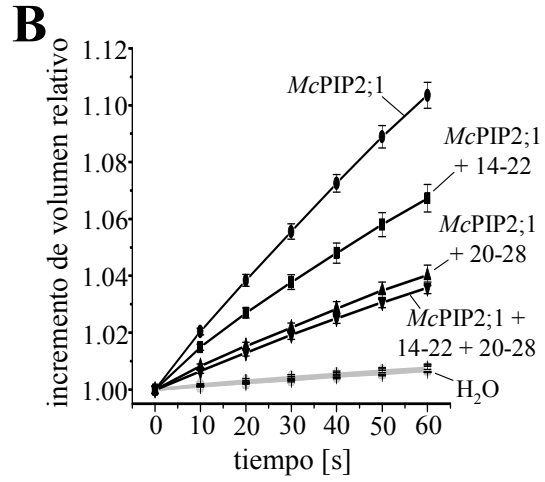
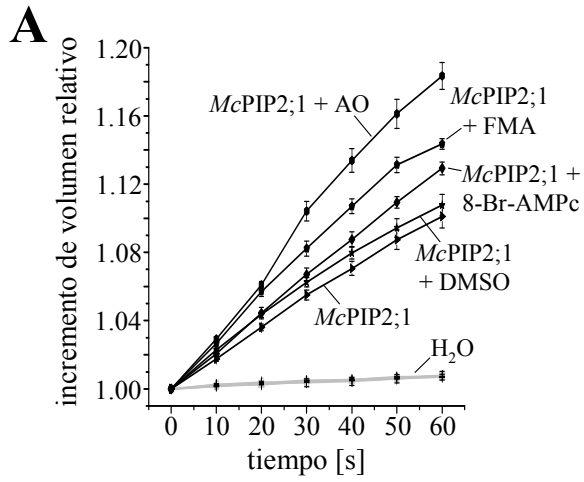
### La actividad de McPIP2;1 como canal de agua está regulada positivamente por fosforilación mediada por PCA y PCC

El análisis de la estructura primaria de McPIP2;1 con el programa NetPhos 2.0 (Technical University of Denmark, CBX) mostró seis residuos de serina susceptibles de ser fosforilados por la proteína cinasa A (PCA) o por la proteína cinasa C (PCC) que se localizan en el lado citoplásmico del canal (Fig. 7), específicamente en las asas B (Ser<sup>123</sup>, PCA) y D (Ser<sup>200</sup>, PCA), y en los extremos N- (Ser<sup>16</sup>, PCC, y Ser<sup>38</sup>, PCA) y C-terminales (Ser<sup>282</sup>, PCC, y Ser<sup>286</sup>, PCA). Para determinar si la actividad de McPIP2;1 como canal de agua está regulada por fosforilación, se incubó a los ovocitos



microinyectados con dicha AQP con los agonistas de la fosforilación ácido okadaico (AO, inhibidor de fosfatasa tipo 1A y 2A), forbol miristato acetato (FMA, activador de PCC) y 8-Br-AMPC (activador de PCA) por 30 min antes de someterlos al choque hiposmótico. La incubación previa de los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1* con AO, FMA u 8-Br-AMPC resultó en incrementos de volumen celular de 18.4 %, 14.4 % y 12.9 %, respectivamente, relativos a los volúmenes iniciales de los ovocitos a los 60 s (Fig. 8A). En concordancia con las diferencias en los incrementos de volumen observados, los valores de  $P_f$  calculados para los ovocitos microinyectados con *McPIP2;1* aumentaron un 72.7 %, 41.9% y 25.7 % en respuesta a AO, FMA y 8-Br-AMPC, respectivamente ( $p < 0.01$  en comparación con ovocitos microinyectados con *McPIP2;1* y sin incubación previa alguna antes de su hinchamiento, Fig. 8C). Los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O no mostraron un cambio considerable en su volumen (Fig. 8A), y por consiguiente, ni en sus valores de  $P_f$  (Fig. 8C) en respuesta al choque hiposmótico impuesto después de incubarlos con AO, FMA u 8-Br-AMPC, en comparación con los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1* ( $p < 0.01$ ). En la Fig. 8C se muestran los valores de  $P_f$  como porcentajes relativos al valor de  $P_f$  (establecido como 100 %) obtenido de los ovocitos microinyectados con *McPIP2;1* que no se incubaron previamente con los agonistas de la fosforilación mencionados. La incubación previa de los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O o con *McPIP2;1*, con 0.1 % dimetil sulfóxido (DMSO, solvente del AO y del FMA), no alteró de manera considerable su incremento de volumen en respuesta al choque hipo-osmótico (Fig. 8A), y por consiguiente, tampoco alteró los valores de  $P_f$  a través de sus membranas (Fig. 8C), lo que indica que los cambios observados se debieron específicamente a la presencia del AO y del FMA.

Para corroborar que la permeabilidad al agua de *McPIP2;1* está afectada efectivamente por fosforilación mediada por PCA y PCC, se utilizaron los péptidos 14-22, inhibidores específicos de PCA (Harris y cols., 1997), y 20-28, inhibidores específicos de PCC (Eichholtz y cols., 1993), como antagonistas de la fosforilación en ensayos de hinchamiento de ovocitos microinyectados con *McPIP2;1* en respuesta a un choque hipo-osmótico. Para realizar estos ensayos, los ovocitos se incubaron por 30 min a temperatura ambiente con los péptidos 14-22 y 20-28, juntos y por separado, antes de realizar el choque hipo-osmótico. La incubación de los ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O (controles negativos) con los péptidos 14-22 y 20-28 no alteró el volumen (Fig. 8B), y por consiguiente, tampoco alteró la  $P_f$  (Fig. 8D) de los mismos después de someterlos al choque hipo-osmótico. Sin embargo, la incubación de los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1* con los péptidos inhibidores 14-22 y 20-28 produjo incrementos de volumen en los ovocitos de 6.7 % y 4.0 %, respectivamente, mientras que la incubación de dichos ovocitos con ambos péptidos resultó en un incremento de volumen de 3.6 % relativo a los volúmenes iniciales, después de 60 s (Fig. 8B). Estos resultados indicaron que la presencia de dichos péptidos inhibidores de cinasas disminuyó la velocidad de hinchamiento de los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1*. Así, de acuerdo con los cambios de volumen observados, la  $P_f$  de los ovocitos microinyectados con *McPIP2;1* (establecida como 100 % en la Fig. 8D) disminuyó un 35.8 % y un 62.1 % cuando dichos ovocitos se incubaron con los péptidos 14-22 y 20-28, respectivamente, y un 65.6 % cuando se incubaron con ambos tipos de péptidos inhibidores ( $p < 0.01$  en comparación con los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1* en ausencia de cualesquiera de los péptidos).



**Figura 8. Regulación de la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua por fosforilación mediada por PCA y PCC.** **A y B**, hinchamiento de los ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O (controles negativos) o con *McPIP2;1* con el tiempo en respuesta a un choque hipo-osmótico después de incubarlos con ácido okadaico (AO, 5 μM), 8-Br-AMPC (40 μM), forbol miristato acetato (FMA, 10 nM), DMSO (0.1%) o con los péptidos 14-22 (1 μM, inhibidores de PCA) y 20-28 (100 μM, inhibidores de PCC) por 30 min. El DMSO se usó para disolver el AO y el FMA (n=15). **C y D**, efecto del 8-Br-AMPC, FMA, AO y de los péptidos 14-22 y 20-28 sobre la permeabilidad osmótica del agua (P<sub>i</sub>) a través de la membrana de los ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O o con *McPIP2;1* calculada a partir de los datos mostrados en A y B. Los valores de P<sub>i</sub> se muestran como porcentajes relativos al valor de P<sub>i</sub> (establecido como 100%) mostrado por los ovocitos inyectados con *McPIP2;1* sin incubación previa alguna (n=15, \*\*\*, p<0.01 en comparación con los ovocitos inyectados con *McPIP2;1* sin preincubación). **E**, inmunodetección de la proteína de *McPIP2;1* (31 kDa) en membranas enriquecidas con membrana plasmática aisladas de los ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O o con *McPIP2;1* e incubados (+) con los péptidos 14-22, 20-28 o con 8-Br-AMPC, AO o FMA mediante ensayos tipo Western blot (resultado representativo de tres experimentos independientes). **F**, efecto de los péptidos 14-22, 20-28 y del 8-Br-AMPC, AO y FMA sobre la fosforilación *in vitro* de *McPIP2;1*. La proteína de *McPIP2;1* fosforilada en las membranas de los ovocitos se inmunoprecipitó y se detectó mediante autoradiografía (inserto). La intensidad relativa de las bandas radiográficas correspondientes se muestra como una gráfica de barras. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

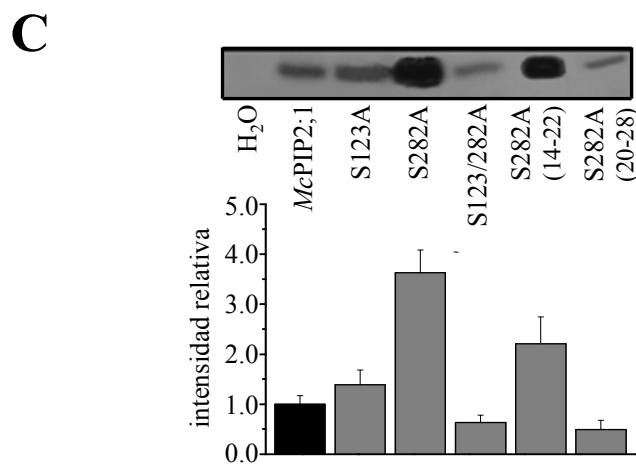
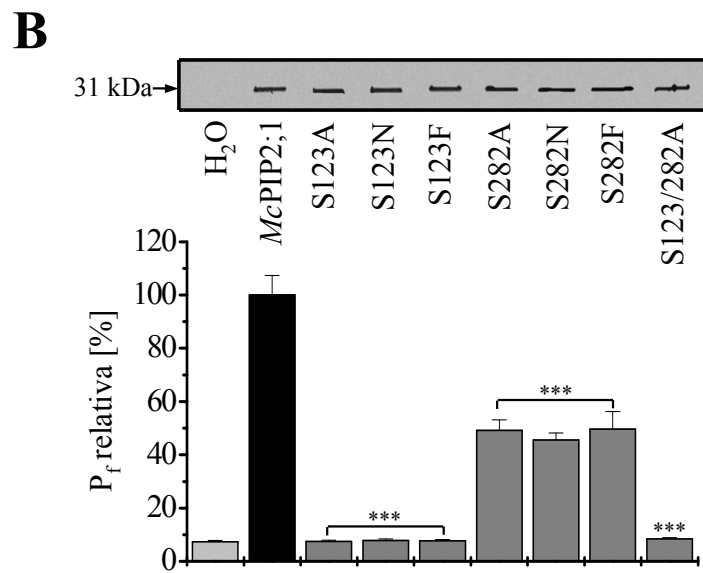
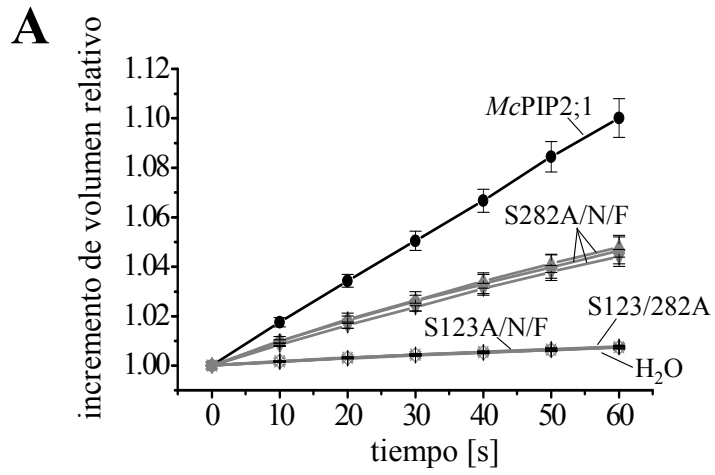
La inmunodetección de *McPIP2;1* mediante ensayos tipo *Western blot* mostró que la expresión de la proteína de *McPIP2;1* en las membranas de los ovocitos no se afectó por la incubación de dichas células con los agonistas y antagonistas de la fosforilación utilizados (Fig. 8E). Estos resultados corroboraron que las vías de fosforilación mediadas por PCA y PCC están directamente involucradas en la regulación de la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua.

También se analizó el estado de fosforilación de *McPIP2;1* en las membranas de los ovocitos microinyectados con ésta AQP mediante ensayos de fosforilación *in vitro*. Se utilizaron membranas aisladas de dichos ovocitos, las cuales se marcaron con [γ-<sup>32</sup>P]-ATP y se utilizaron para inmunoprecipitar a la proteína de *McPIP2;1* con la ayuda de un anticuerpo péptido-específico anti-*McPIP2;1*. Finalmente, se detectó a la proteína de *McPIP2;1* fosforilada mediante autoradiografía. Las autoradiografías de los inmunoprecipitados obtenidos a partir de las membranas de los ovocitos marcadas con γ-<sup>32</sup>P mostraron que *McPIP2;1* se encuentra fosforilada constitutivamente en dichas membranas (Fig. 8F, inserto). En respuesta al AMPC, al AO y al FMA, el nivel de fosforilación de *McPIP2;1* aumentó 3.8 veces (Fig. 8F, gráfica de barras), mientras que la incubación de los ovocitos con los péptidos inhibidores 14-22 y 20-28 disminuyó 0.34 y 0.59 veces, respectivamente, el nivel de fosforilación de *McPIP2;1* (Fig. 8F, gráfica de barras). Estos resultados, junto con aquellos que mostraron que la permeabilidad al agua de *McPIP2;1* aumentó en presencia de AO, FMA y 8-Br-AMPC, y disminuyó en respuesta a los péptidos inhibidores 14-22 y 20-28 (Fig. 8A y B), indican que la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua está regulada positivamente por fosforilación mediada por PCA y PCC.

## La actividad de *McPIP2;1* como canal de agua está regulada por los residuos Ser<sup>123</sup> y Ser<sup>282</sup>

Para caracterizar con mayor detalle la regulación de la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua por fosforilación se mutaron los residuos Ser<sup>123</sup> (conservado en todas las PIPs y localizado en un motivo de fosforilación por PCA) y Ser<sup>282</sup> (conservado en todas las PIP2s y localizado en un motivo de fosforilación por PCC) de dicha AQP mediante mutagénesis dirigida a sitio para elucidar su función en la permeabilidad al agua del canal. Cada residuo de aminoácido se reemplazó por alanina, asparagina o fenilalanina para evitar la fosforilación de la AQP en esos sitios y para descartar efectos debidos a cambios conformacionales en la proteína provocados por la presencia de residuos con carga diferente a la de la serina. Las mutantes simples *McPIP2;1-S123A*, *McPIP2;1-S123N*, *McPIP2;1-S123F*, *McPIP2;1-S282A*, *McPIP2;1-S282N*, *McPIP2;1-S282F* y la mutante doble *McPIP2;1-S123/282A* se expresaron por separado en los ovocitos para llevar a cabo los ensayos de hinchamiento y determinar la  $P_f$  a través de las membranas de estos ovocitos bajo condiciones similares a las descritas para los ovocitos que expresaron a la forma de *McPIP2;1* silvestre (sin mutar). Las velocidades de hinchamiento de los ovocitos que expresaron a las formas mutadas de *McPIP2;1* se afectaron severamente después del choque hipo-osmótico. El volumen de los ovocitos que expresaron a cualquiera de las formas mutantes simples *McPIP2;1-S282* se incrementó un 4.6 %, después de 60 s, con respecto de su volumen inicial (Fig. 9A), mientras que el volumen de los ovocitos que expresaron tanto a las formas mutantes simples *McPIP2;1-S123* como a la doble mutante *McPIP2;1-S123/282A* no cambió después del choque hipo-osmótico (Fig. 9A). Consecuentemente, los valores de  $P_f$  calculados para los ovocitos que expresaron a las formas mutantes simples *McPIP2;1-S282* mostraron una disminución del 51.9 % con respecto al valor de  $P_f$  obtenido de los ovocitos microinyectados con *McPIP2;1* silvestre (establecido como 100 % en la Fig. 9B,  $p < 0.01$ ), mientras que los ovocitos que expresaron a las formas mutantes simples *McPIP2;1-S123* o a la doble mutante *McPIP2;1-S123/282A* mostraron incrementos pequeños en sus valores de  $P_f$  similares a aquellos observados en los ovocitos microinyectados con H<sub>2</sub>O (7.3 %, Fig. 9B,  $p < 0.01$  en comparación con los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1* silvestre). Por lo tanto, la ausencia del residuo Ser<sup>123</sup> inhibió la permeabilidad al agua de *McPIP2;1* mientras que la falta del residuo Ser<sup>282</sup> sólo la inhibió parcialmente.

Para demostrar que las diferencias en los valores de  $P_f$  obtenidos no se debieron a diferencias en la expresión de las proteínas de las formas mutantes de *McPIP2;1* en las membranas de los ovocitos, se analizaron los niveles de proteína de las formas mutantes en dichas membranas mediante ensayos tipo Western blot. Como se muestra en la Fig. 9B (inserto), se observaron cantidades similares del polipéptido de 31 kDa, correspondiente con el peso molecular esperado para *McPIP2;1*, en las membranas aisladas de los ovocitos que expresaron tanto a la forma silvestre de *McPIP2;1* como a las formas mutantes simples, *McPIP2;1-S123* y *McPIP2;1-S282*, y doble, *McPIP2;1-S123/282A*. Estos resultados confirmaron que los cambios en los valores de  $P_f$  observados en los ovocitos que expresaron a las formas mutantes de *McPIP2;1* se debieron específicamente a las sustituciones de aminoácidos realizadas.



**Figura 9. Los residuos Ser<sup>123</sup> y Ser<sup>282</sup> son necesarios para la actividad de McPIP2;1 como canal de agua.** **A**, hinchamiento de los ovocitos inyectados con la forma silvestre de McPIP2;1 o con las mutantes McPIP2;1-S123A, McPIP2;1-S123N, McPIP2;1-S123F, McPIP2;1-S282A, McPIP2;1-S282N, McPIP2;1-S282F y McPIP2;1-S123/282A con el tiempo en respuesta a un choque hipo-osmótico (n=15). **B**, efecto de la Ser<sup>123</sup> y de la Ser<sup>282</sup> sobre la P<sub>f</sub> y sobre la expresión de McPIP2;1 en los ovocitos microinyectados con McPIP2;1. Los valores de P<sub>f</sub> se calcularon a partir de los datos obtenidos en A y se muestran como porcentajes relativos al valor de P<sub>f</sub> (establecido como 100%) mostrado por los ovocitos inyectados con la forma silvestre de McPIP2;1 (n=15, \*\*\*, p<0.01 en comparación con los ovocitos inyectados con la forma silvestre de McPIP2;1). Las formas silvestre y mutadas de McPIP2;1 se inmunodetectaron en membranas enriquecidas con membrana plasmática aisladas de los ovocitos mediante ensayos tipo Western blot (inserto, membrana representativa de tres experimentos independientes). **C**, influencia de la Ser<sup>123</sup> y de la Ser<sup>282</sup> sobre la fosforilación *in vitro* de McPIP2;1, y efecto de los péptidos 14-22 y 20-28, inhibidores de PCA y PCC respectivamente, sobre el nivel de fosforilación de la mutante McPIP2;1-S282A. Las proteínas de las formas silvestre y mutadas de McPIP2;1 fosforiladas en las membranas de los ovocitos se inmunoprecipitaron y se detectaron mediante autoradiografía (inserto). La intensidad relativa de las bandas radiográficas correspondientes se muestra como una gráfica de barras. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

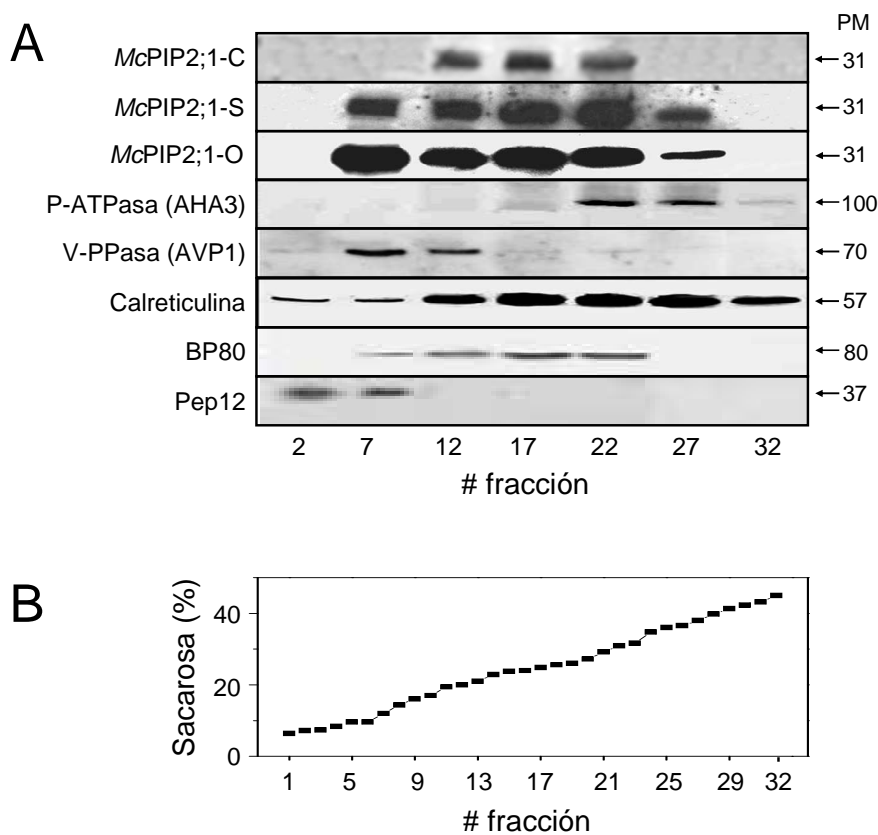
Mediante ensayos de fosforilación *in vitro* e inmunoprecipitación se mostró que el estado de fosforilación de McPIP2;1 no se altera en la mutante McPIP2;1-S123A (Fig. 9C), sin embargo, en la mutante McPIP2;1-S282A aumenta 3.6 veces en comparación con el nivel de fosforilación de McPIP2;1 silvestre (Fig. 9C).

Para determinar el mecanismo responsable del incremento de fosforilación observado en la mutante McPIP2;1-S282A se probó el efecto de los péptidos 14-22 y 20-28, inhibidores de PCA y PCC, respectivamente, sobre el estado de fosforilación de esta mutante (Fig. 9C, inserto). El nivel de fosforilación de la mutante McPIP2;1-S282A se redujo 0.40 y 0.87 veces en presencia de los péptidos 14-22 y 20-28, respectivamente (Fig. 9C), lo que sugiere que la PCC está involucrada principalmente en el incremento de fosforilación observado en esta mutante. Aunado a lo anterior, la mutante doble McPIP2;1-S123/282A mostró un nivel de fosforilación 0.37 veces menor al mostrado por McPIP2;1 silvestre, lo cual indicó que McPIP2;1 se encontró fosforilada en sitios diferentes a la Ser<sup>123</sup> y a la Ser<sup>282</sup>.

### **McPIP2;1 se localiza subcelularmente en tres grupos de membranas: retículo endoplásmico/complejo de Golgi, tonoplasto y membrana plasmática**

Para determinar la localización subcelular de McPIP2;1 se realizaron ensayos de inmunodetección e identificación de marcadores moleculares de membranas en microsomas (vesículas de membrana pequeñas, originadas del complejo de Golgi, de la MP, del TP y del RE, que se forman cuando las células vegetales se homogenizan en un medio iso-osmótico) aislados de raíces de *M. crystallinum* sin tratar (control, C),

fraccionados y separados, por su densidad, mediante gradientes continuos (5% a 46% [p/v]) de sacarosa. Una vez distribuidos los microsomas por todo el gradiente de sacarosa se colectaron 32 fracciones totales (Fig. 10B), de las cuales se tomaron siete (fracciones 2, 7, 12, 17, 22, 27 y 32) como representativas de todo el gradiente para realizar ensayos de inmunodetección por *Western blot* e identificar a la AQP *McPIP2;1* y a los marcadores moleculares de membrana plasmática (MP, P-ATPasa, gen AHA3), de tonoplasto (TP, V-PPasa, gen AVP1), de retículo endoplásmico (RE, calreticulina), de complejo de Golgi (BP-80) y de compartimientos prevacuolares (CPV, Pep12).



**Figura 10. Localización de *McPIP2;1* en membranas subcelulares de la raíz de *M. crystallinum* en respuesta a salinidad y estrés osmótico.** **A**, Ensayos tipo *Western blot* de microsomas aislados de raíces de plantas control (C, sin tratamiento) y de plantas tratadas con sal (S, 200 mM NaCl-7 días) o con manitol (O, 200 mM-48 h). Los microsomas se fraccionaron y separaron mediante gradientes continuos (5%-46%) de sacarosa. Se muestran siete fracciones (2, 7, 12, 17, 22, 27 y 32) representativas de las 32 fracciones (**B**) colectadas del gradiente. La acuaporina *McPIP2;1* (31 kDa) y los marcadores de membranas P-ATPasa (AHA3, membrana plasmática), V-PPasa (AVP1, tonoplasto), calreticulina (retículo endoplásmico), BP80 (complejo de Golgi, compartimientos prevacuolares) y Pep12 (compartimientos prevacuolares) se detectaron inmunológicamente. PM: peso molecular en kDa. **B**, Concentraciones de sacarosa en las treinta y dos fracciones colectadas del gradiente. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

Como se muestra en la Figura 10A, McPIP2;1 se encontró entre las fracciones 12 a 22 mientras que la MP se detectó entre las fracciones 22 a 27, el TP entre las fracciones 7 a 12, el RE entre las fracciones 2 a 32, el complejo de Golgi entre las fracciones 7 a 22 y los CPV entre las fracciones 2 a 7. Estos resultados muestran que McPIP2;1 se localizó en fracciones microsomas enriquecidas con MP, TP, RE y complejo de Golgi.

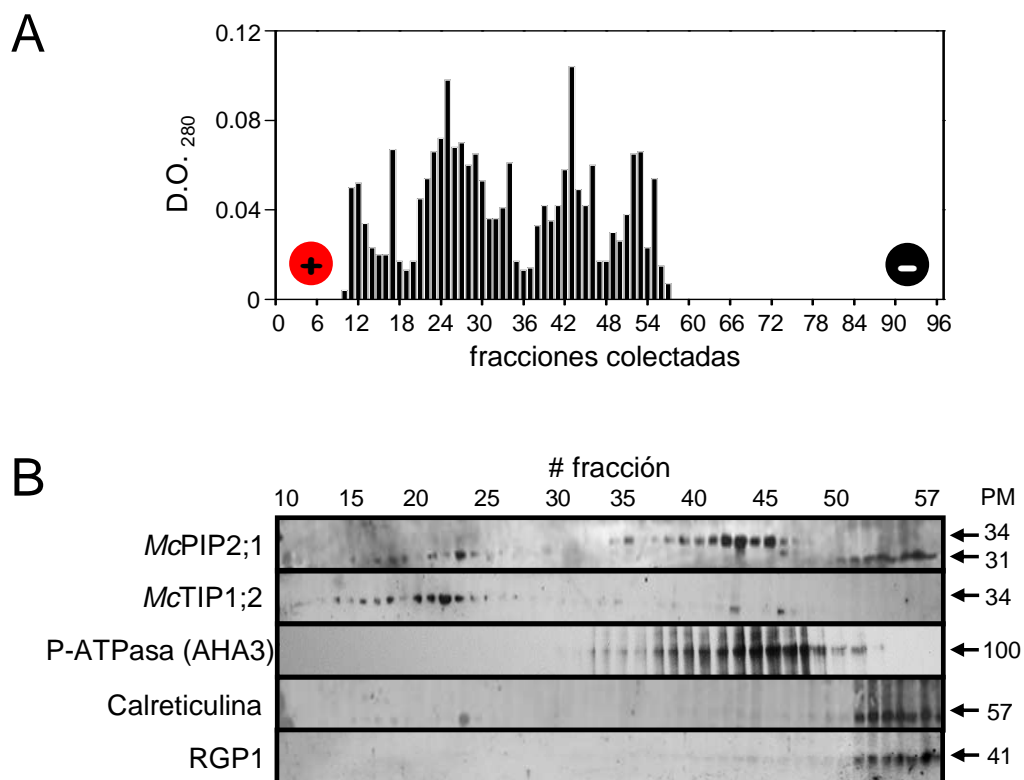
El fraccionamiento y la separación de los microsomas por su densidad mediante gradientes continuos de sacarosa permitió la separación entre sí de las vesículas de MP y las del TP, sin embargo, las vesículas del RE se distribuyeron por todo el gradiente y las del complejo de Golgi también se encontraron en fracciones con MP o TP (Fig. 10A). Este tipo de contaminaciones son inherentes a la técnica debido a que vesículas de diferente origen pueden presentar tamaños y densidades similares, además de que se pueden formar vesículas de diferente tamaño y densidad a partir de un mismo tipo de membrana. Debido a esto, no se puede definir de manera precisa la localización subcelular de McPIP2;1 con los resultados obtenidos mediante gradientes continuos de sacarosa. Como alternativa, se decidió utilizar el sistema de electroforesis zonal de flujo libre (EZFL) para separar a los microsomas de las raíces de *M. crystallinum* por su carga superficial neta y no por su densidad, con el fin de obtener una mejor definición en la separación de las distintas membranas subcelulares contenidas en los microsomas.

La electroforesis zonal de flujo libre (EZFL) es una técnica de electromigración mediante la cual se puede separar una mezcla compleja de membranas subcelulares con base en su carga superficial neta, la cual se atribuye a las cabezas polares de los lípidos y de las proteínas embebidas en ellas y es, por lo tanto, específica para cada tipo de membrana subcelular (Canut y cols., 1999). Los microsomas aislados de raíces de *M. crystallinum* sin tratamiento alguno (controles) se cargaron continuamente en la cámara de separación del sistema de EZFL sometida a un campo eléctrico perpendicular al flujo de la muestra, debido al cual los microsomas se fraccionaron y separaron conforme atravesaron la cámara de separación. Al final de la corrida se colectaron 96 fracciones en las cuales se determinó el perfil de distribución de proteínas microsomas (Fig. 11A) a partir del cual se seleccionó el rango entre las fracciones 10 a 57 para llevar a cabo la inmunodetección de McPIP2;1 y de los marcadores moleculares de MP (P-ATPasa, gen AHA3), de TP (McTIP1;2), de RE (calreticulina) y de complejo de Golgi (RGP1) mediante ensayos tipo *Western blot*.

Como se muestra en la Figura 11B, el TP y la MP se identificaron entre las fracciones 14 a 27 y 33 a 51, respectivamente, mientras que tanto el RE como el complejo de Golgi se detectaron entre las fracciones 51 a 57. Estos resultados muestran que mediante el sistema de EZFL se logró separar a los microsomas de la raíz de *M. crystallinum* en tres grupos de membranas subcelulares puros: uno con TP, otro con MP y otro con la mezcla RE/Golgi. La obtención de un grupo de fracciones con membranas tanto de RE como de complejo de Golgi se pudo deber a la asociación tan estrecha a nivel físico y de transporte que existe entre ambos organelos subcelulares (Faso y cols., 2009). McPIP2;1 se encontró en fracciones correspondientes con los tres



grupos de membranas subcelulares purificados (Fig. 11B). Por lo tanto, *McPIP2;1* se localiza subcelularmente en la MP, en el TP y en el RE o complejo de Golgi.



**Figura 11. Distribución de *McPIP2;1* en membranas subcelulares de la raíz de *M. crystallinum* purificadas mediante EZFL. **A**, Perfil de distribución de proteínas microsomales en las 96 fracciones colectadas mediante el sistema de EZFL. La cantidad de proteína en las fracciones colectadas se muestra en unidades de densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 280 nm. Los signos positivo (+) y negativo (-) simbolizan el campo eléctrico por el cual se separaron los microsomas dentro de la cámara de separación del equipo de EZFL. **B**, Análisis tipo Western blot de las 48 fracciones (10 a 57) con proteína mostradas en A. El anticuerpo anti-*McPIP2;1* reconoce dos isoformas de *McPIP2;1* con diferente peso molecular (31 y 34 kDa). La detección de los marcadores de membranas *McTIP1;2* (tonoplasto), P-ATPasa (AHA3, membrana plasmática), calreticulina (retículo endoplásmico) y RGP1 (complejo de Golgi) se realizó mediante ensayos inmunológicos. PM: peso molecular en kDa. Resultados representativos de dos experimentos independientes.**

## **La salinidad y el estrés osmótico aumentan los niveles de proteína de *McPIP2;1* pero no afectan su distribución subcelular**

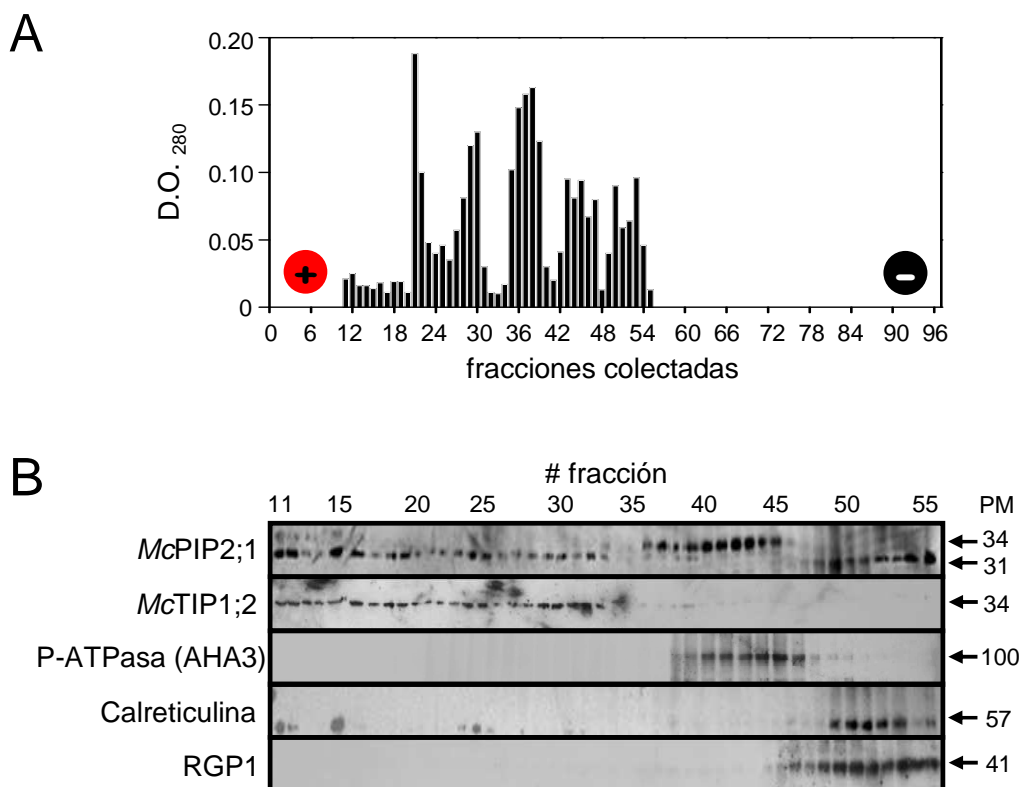
El efecto de la salinidad (S) y del estrés osmótico (O) sobre la expresión y distribución subcelular de *McPIP2;1* se analizó mediante el fraccionamiento de microsomas aislados de raíces de *M. crystallinum*, tratadas con 200 mM NaCl por 7 días o con 200 mM manitol por 48 h, por medio de gradientes continuos de sacarosa en combinación con ensayos tipo *Western blot*. En respuesta tanto a la salinidad como al estrés osmótico se observó un aumento en la expresión de *McPIP2;1* entre las fracciones 7 a 27 del gradiente de sacarosa en comparación con su expresión en fracciones microsomales provenientes de plantas sin tratar (controles, C, Fig. 10A). Las fracciones 7 a 27 se encontraron enriquecidas con MP, TP, RE y complejo de Golgi, organelos celulares en los cuales también se encontró a *McPIP2;1* bajo condiciones control (Fig. 10A). Estos resultados muestran que tanto la salinidad como el estrés osmótico aumentaron la abundancia de la proteína de *McPIP2;1* pero no afectaron su distribución subcelular.

Como se menciona y explica anteriormente, mediante el uso de gradientes continuos de sacarosa no se logró definir de manera precisa la localización subcelular de *McPIP2;1*. Entonces, para corroborar los resultados obtenidos sobre la expresión y distribución subcelular de *McPIP2;1* mediante el uso de gradientes continuos de sacarosa, se llevó a cabo la separación de los microsomas aislados de raíces de *M. crystallinum* tratadas con sal (200 mM NaCl por 7 días) o bajo estrés osmótico (200 mM sorbitol por 48 h) mediante EZFL.

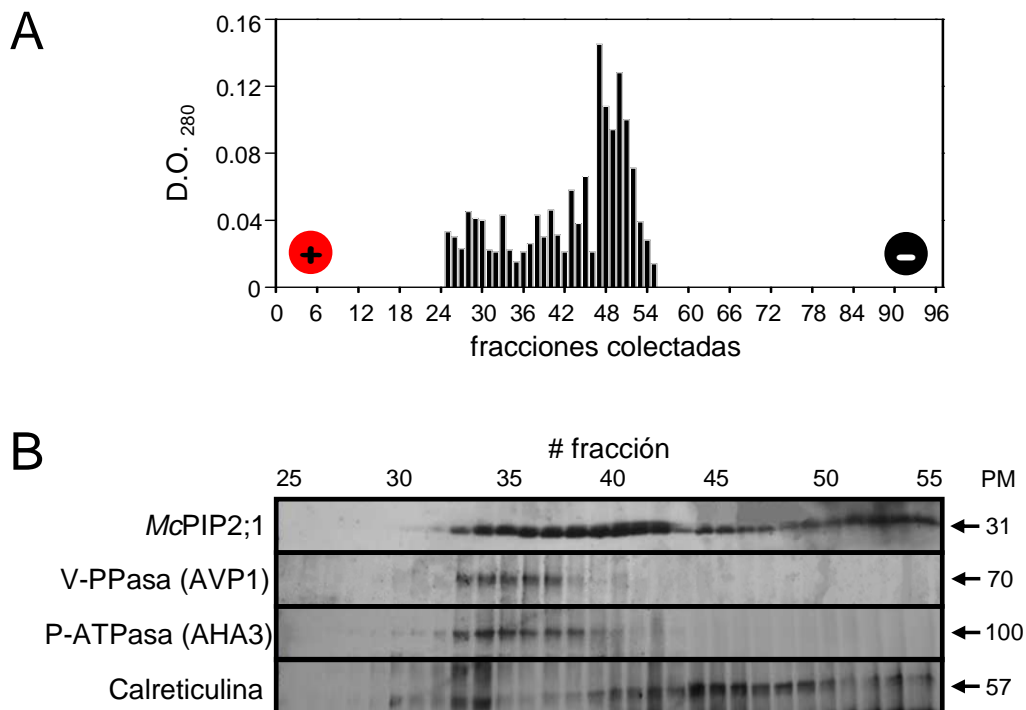
A partir del perfil de distribución de proteínas microsomales provenientes de raíces de *M. crystallinum* tratadas con sal, mostrado en la Figura 12A, se seleccionó el rango entre las fracciones 11 a 55 para llevar a cabo la inmunodetección de *McPIP2;1* y de los marcadores moleculares de MP (P-ATPasa, gen AHA3), de TP (*McTIP1;2*), de RE (calreticulina) y de complejo de Golgi (RGP1) mediante ensayos tipo *Western blot*. Como se muestra en la Figura 12B, el TP y la MP se identificaron entre las fracciones 11 a 34 y 38 a 48, respectivamente, mientras que el RE se detectó entre las fracciones 49 a 55 y el complejo de Golgi entre las fracciones 45 a 55. Estos resultados muestran que los microsomas de raíces de *M. crystallinum* tratadas con sal también se separaron, mediante EZFL, en los tres grupos de membranas subcelulares puros (TP, MP y mezcla RE/Golgi) identificados a partir de microsomas de raíces de plantas control (Fig. 11B). En respuesta a sal, *McPIP2;1* se encontró en fracciones microsomales correspondientes con los tres grupos de membranas subcelulares purificados (Fig. 12B). Además, el fraccionamiento por EZFL de los microsomas de raíces de *M. crystallinum* tratadas con sal muestra incrementos en la intensidad y en el número de las fracciones microsomales que contienen a *McPIP2;1* (Fig. 12B) en comparación con las fracciones microsomales obtenidas a partir de microsomas de raíces de plantas control (sin tratar, Fig. 11B). Estas observaciones pueden explicar y corroborar, por consiguiente, el aumento de expresión de la proteína de *McPIP2;1* observado en los microsomas de raíces de plantas tratadas con sal separados mediante gradientes continuos de sacarosa (Fig. 10A). Por lo tanto, la salinidad aumenta la abundancia de *McPIP2;1* y no altera la distribución subcelular de esta AQP. *McPIP2;1* continua localizándose en la MP, en el TP y en el RE o complejo de Golgi bajo salinidad.

Para lograr la obtención de fracciones microsomales puras de MP, de TP y de la mezcla RE/Golgi mediante EZFL se excluyó a la albúmina sérica bovina (ASB) del medio de homogenización utilizado para el aislamiento de los microsomas de las raíces de *M. crystallinum*. La ASB es un agente comúnmente utilizado como estabilizador de proteínas, ya que puede actuar como sustrato de proteasas o puede interactuar con las proteínas para estabilizar su conformación nativa. Sin embargo, la ASB es una proteína con carga negativa a pH fisiológico, y por tanto, puede interactuar con las proteínas de los microsomas y alterar su carga neta, lo cual enmascararía la carga real de los microsomas y, por consiguiente, dificultaría su fraccionamiento mediante EZFL. La falta de enmascaramiento de cargas debida a la ausencia de la ASB podría explicar el fraccionamiento exitoso de los microsomas de raíces de plantas sin tratar (Fig. 11B) y tratadas con sal (Fig. 12B) en los tres grupos de membranas subcelulares (TP, MP y mezcla RE/Golgi) purificados. Sin embargo, bajo condiciones de estrés osmótico (200 mM sorbitol por 48 h) se obtuvo muy poca cantidad de proteína en las fracciones microsomales separadas y colectadas mediante EZFL, y por consiguiente, no se logró llevar a cabo la inmunodetección de *McPIP2;1* y de los marcadores de membranas subcelulares mediante ensayos tipo Western blot (datos no mostrados). La degradación de proteínas es un proceso común en plantas bajo estrés osmótico, como en el caso de la sequía (Wisniewski y Zagdanska, 2001; Ingram y Bartel, 1996), y por tanto, la poca cantidad de proteína obtenida en dichas fracciones microsomales se pudo deber a la incapacidad de la planta para contender con la degradación de proteínas y/o a la ausencia de ASB durante el homogenizado de las raíces.

Mediante el aislamiento de los microsomas de raíces de *M. crystallinum* bajo estrés osmótico (200 mM sorbitol por 48 h) en presencia de ASB y su posterior fraccionamiento por EZFL se obtuvo el perfil de distribución de proteínas microsomales mostrado en la Figura 13A, a partir del cual se seleccionó el rango entre las fracciones 25 a 55 para realizar los ensayos de inmunodetección de *McPIP2;1* y de los marcadores moleculares de TP (V-PPasa, gen AVP1), de MP (P-ATPasa, gen AHA3) y de RE (calreticulina) por Western blot. Como se muestra en la Figura 13B, *McPIP2;1* se detectó entre las fracciones 32 a 55, el TP y la MP se identificaron entre las fracciones 33 a 38 y 31 a 41, respectivamente, y el RE se detectó entre las fracciones 30 a 55. Estos resultados muestran que el TP, la MP y el RE, contenidos en los microsomas de raíces de *M. crystallinum* bajo estrés osmótico, no se separaron entre sí mediante el sistema de EZFL cuando los microsomas se aislaron en presencia de ASB. Por lo tanto, con estos resultados no se puede determinar la localización subcelular precisa de *McPIP2;1* en las raíces de *M. crystallinum* bajo estrés osmótico. Sin embargo, el fraccionamiento por EZFL de los microsomas de raíces de *M. crystallinum* bajo estrés osmótico, aislados en presencia de ASB, muestra incrementos en la intensidad de las fracciones microsomales que contienen a *McPIP2;1* (Fig. 13B) en comparación con las fracciones microsomales obtenidas a partir de microsomas de raíces de plantas control (sin tratar, Fig. 11B). Esta observación puede explicar y, por consiguiente, corroborar el aumento de expresión de la proteína de *McPIP2;1* observado en los microsomas de raíces de plantas bajo estrés osmótico separados mediante gradientes continuos de sacarosa (Fig. 10A).



**Figura 12. Distribución de *McPIP2;1* en membranas subcelulares aisladas de raíces de *M. crystallinum* tratadas con sal y purificadas mediante EZFL.** Los microsomas fraccionados y purificados mediante EZFL se aislaron de raíces de *M. crystallinum* tratadas con 200 mM NaCl por 7 días. **A**, Perfil de distribución de proteínas microsomales en las 96 fracciones colectadas mediante el sistema de EZFL. La cantidad de proteína en las fracciones colectadas se muestra en unidades de densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 280 nm. Los signos positivo (+) y negativo (-) simbolizan el campo eléctrico por el cual se separaron los microsomas dentro de la cámara de separación del equipo de EZFL. **B**, Análisis tipo Western blot de las 45 fracciones (11 a 55) con proteína mostradas en A. El anticuerpo anti-*McPIP2;1* reconoce dos isoformas de *McPIP2;1* (31 y 34 kDa). La detección de los marcadores de membranas *McTIP1;2* (tonoplasto), P-ATPasa (AHA3, membrana plasmática), calreticulina (retículo endoplásmico) y RGP1 (complejo de Golgi) se realizó mediante ensayos inmunológicos. PM: peso molecular en kDa. Resultados representativos de dos experimentos independientes.



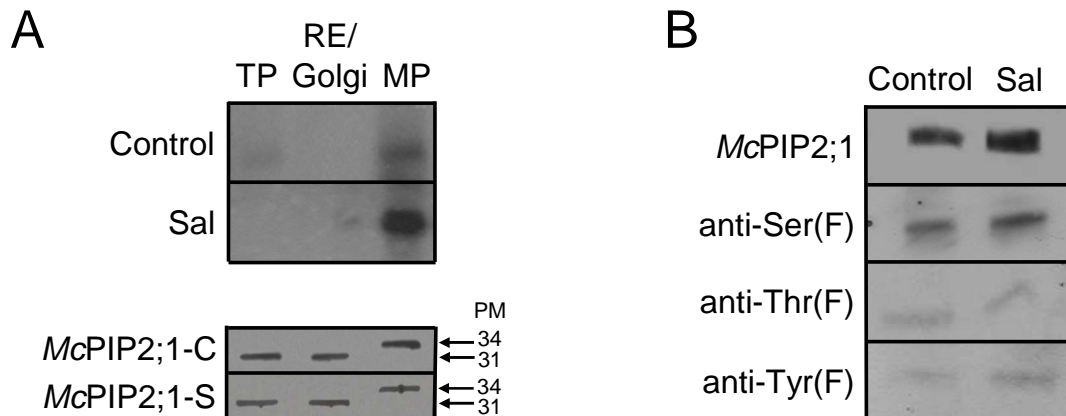
**Figura 13. Distribución de *McPIP2;1* en membranas subcelulares aisladas de raíces de *M. crystallinum* bajo estrés osmótico y separadas mediante EZFL.** Los microsomas de raíces de *M. crystallinum* tratadas con 200 mM sorbitol por 48 h se aislaron en presencia de albúmina sérica bovina y después se fraccionaron mediante EZFL. **A**, Perfil de distribución de proteínas microsomales en las 96 fracciones colectadas mediante el sistema de EZFL. La cantidad de proteína en las fracciones colectadas se muestra en unidades de densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 280 nm. Los signos positivo (+) y negativo (-) simbolizan el campo eléctrico por el cual se separaron los microsomas dentro de la cámara de separación del equipo de EZFL. **B**, Análisis tipo Western blot de las 31 fracciones (25 a 55) con proteína mostradas en A. Se muestra la detección inmunológica de *McPIP2;1* y de los marcadores de membranas V-PPasa (AVP1, tonoplasto), P-ATPasa (AHA3, membrana plasmática) y calreticulina (retículo endoplásmico). PM: peso molecular en kDa. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

### **McPIP2;1 se fosforila en la membrana plasmática y su nivel de fosforilación aumenta en respuesta a sal**

De manera interesante, el anticuerpo anti-McPIP2;1 reconoció específicamente una banda de 34 kDa entre las fracciones microsomales 34 a 47 (Fig. 11B) y 36 a 46 (Fig. 12B) obtenidas mediante EZFL, provenientes de raíces de *M. crystallinum* sin tratar (controles) y de raíces de *M. crystallinum* tratadas con sal, respectivamente. Dichas fracciones microsomales corresponden a fracciones puras de MP (Figs. 11B y 12B), y el cambio en el peso molecular (de 31 kDa a 34 kDa) de la proteína identificada sugiere que McPIP2;1 presenta algún tipo de modificación post-traducciona cuando se localiza en la MP. El análisis de la estructura primaria de McPIP2;1 indica que esta AQP se puede modificar post-traduccionalmente por fosforilación (NetPhos 2.0, Technical University of Denmark, CBS) y O-glicosilación (NetOGlyc 3.1, Technical University of Denmark, CBS).

Para determinar si McPIP2;1 se fosforila en las membranas subcelulares en las cuales se localiza se llevaron a cabo ensayos de fosforilación *in vitro* e inmunoprecipitación en fracciones microsomales representativas de los tres grupos de membranas (TP, MP y RE/Golgi) separados entre sí mediante EZFL. Como se muestra en los autoradiogramas de la Figura 14A (panel superior), McPIP2;1 se fosforiló únicamente en las fracciones puras de MP y su nivel de fosforilación se incrementó 4.7 veces en respuesta a sal (200 mM NaCl por 7 días). La inmunodetección de McPIP2;1 en las fracciones microsomales con TP, RE/Golgi o MP utilizadas en los ensayos de fosforilación mostró niveles de proteína similares tanto en condiciones control (C, plantas sin tratar) como en condiciones de salinidad (S, Fig. 14A, panel inferior). Por lo tanto, McPIP2;1 se encuentra fosforilada en la MP pero no en el TP ni en el RE o complejo de Golgi, y sus niveles de fosforilación se incrementan en respuesta a sal. Estos resultados también sugieren que el cambio en el peso molecular de McPIP2;1 cuando se localiza en las fracciones microsomales con MP purificadas mediante EZFL se debe a la fosforilación de la AQP. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que McPIP2;1 también se modifique post-traduccionalmente por O-glicosilación.

Para determinar los residuos de aminoácidos en los cuales se fosforila McPIP2;1 cuando se localiza subcelularmente en la MP se llevaron a cabo ensayos tipo *Western blot* en las fracciones microsomales con MP purificadas mediante EZFL. Se inmunoprecipitó la proteína de McPIP2;1 contenida en las fracciones puras de MP con un anticuerpo péptido-específico y mediante el uso de anticuerpos que reconocen a proteínas fosforiladas específicamente en residuos de serina (anti-Ser(F)), treonina (anti-Thr(F)) o tirosina (anti-Tyr(F)) se encontró que la isoforma de McPIP2;1 (34 kDa) localizada en la MP se fosforila principalmente en residuos de serina tanto en raíces de *M. crystallinum* sin tratar (control) como en raíces de *M. crystallinum* tratadas con sal (Fig. 14B).

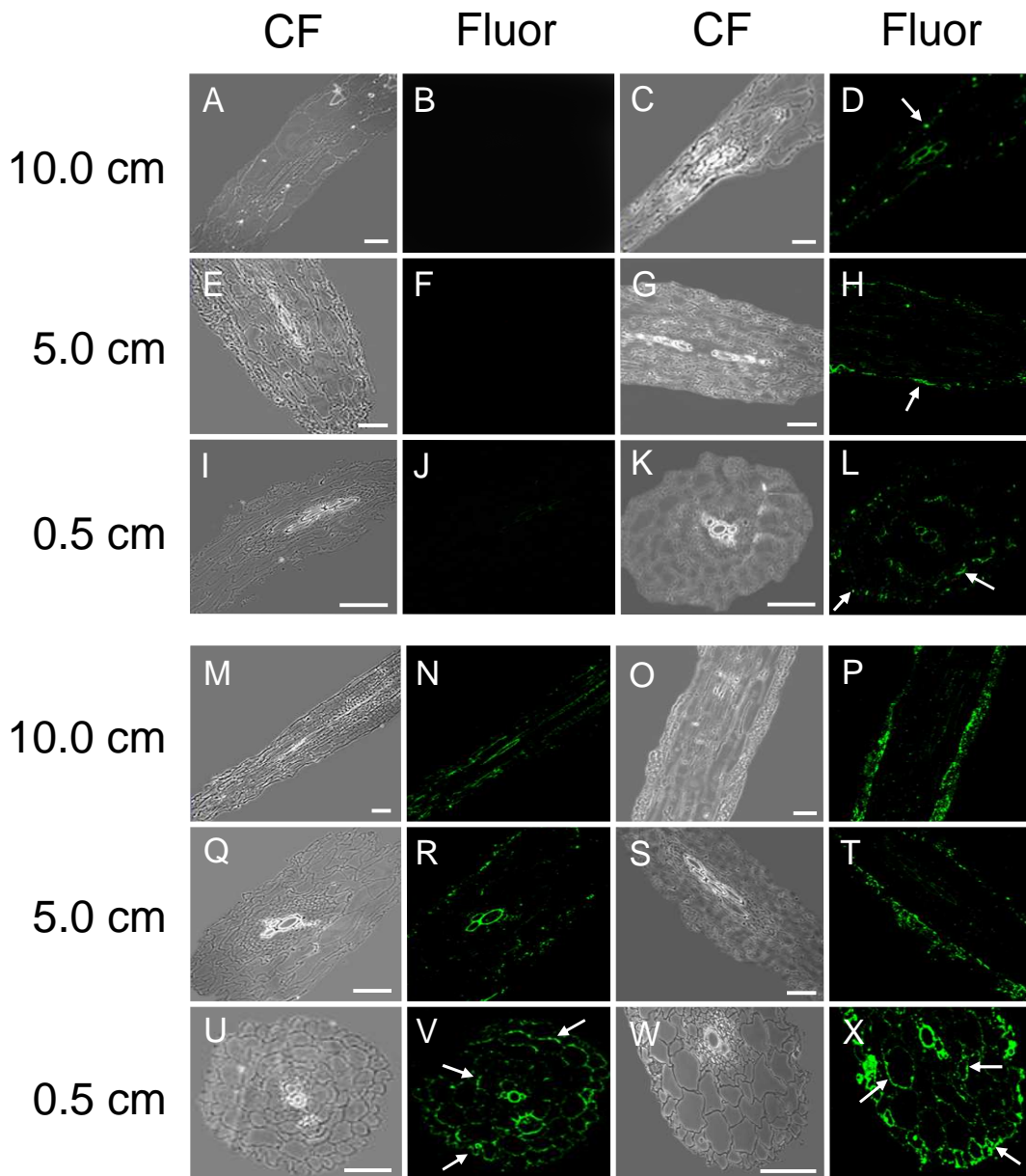


**Figura 14. Fosforilación de *McPIP2;1* en fracciones de membrana plasmática purificadas de la raíz de *M. crystallinum* mediante EZFL.** Los microsomas de raíces de *M. crystallinum* sin tratar (C, control) y tratadas con 200 mM NaCl por 7 días (S, sal) se separaron en fracciones puras de tonoplasto (TP), retículo endoplásmico (RE)/complejo de Golgi y membrana plasmática (MP) mediante EZFL como se describe en Materiales y Métodos y se muestra en las Figs. 11B y 12B. **A**, (panel superior) fosforilación *in vitro* de *McPIP2;1* en fracciones puras de TP, RE/Golgi y MP de la raíz de *M. crystallinum*. Las proteínas de *McPIP2;1* fosforiladas y contenidas en las fracciones puras de TP, RE/Golgi y MP se inmunoprecipitaron con un anticuerpo péptido-específico anti-*McPIP2;1* y se detectaron mediante autoradiografía. (Panel inferior) Inmunodetección de *McPIP2;1* en las fracciones puras de TP, RE/Golgi y MP mediante ensayos tipo Western blot. El anticuerpo anti-*McPIP2;1* reconoce dos isoformas de *McPIP2;1* (31 y 34 kDa). PM: peso molecular en kDa. **B**, detección inmunológica de *McPIP2;1* y de sus isoformas fosforiladas en residuos de serina, treonina o tirosina en la fracción pura de MP mediante ensayos tipo Western blot. Las proteínas de *McPIP2;1* y de sus isoformas fosforiladas contenidas en la fracción pura de MP se inmunoprecipitaron y se identificaron mediante el uso de anticuerpos anti-*McPIP2;1* y anti-residuos fosforilados (anti-Ser(F), anti-Thr(F) y anti-Tyr(F)). Resultados representativos de dos experimentos independientes.

### ***McPIP2;1* se localiza en células de la epidermis, de la endodermis y del tejido vascular de la raíz de *Mesembryanthemum crystallinum***

Se ha demostrado que durante el desarrollo de la raíz de la planta de maíz los tejidos radiculares más alejados de la punta se hacen menos permeables al flujo de agua y de solutos (Frensch y cols., 1996), lo que sugiere posibles cambios en la expresión y distribución de las AQPs a lo largo del eje de crecimiento de las raíces. Con base en esta premisa se analizó la distribución celular de *McPIP2;1* a lo largo de la raíz de *M. crystallinum*. Para esto, se llevaron a cabo ensayos de localización inmunocitológica indirecta de *McPIP2;1* en cortes transversales realizados a 0.5 cm, 5.0 cm y 10.0 cm de la punta de raíces de *M. crystallinum* mediante el uso de anticuerpos secundarios fluorescentes alexa fluor 488 en combinación con microscopía confocal. En los cortes cercanos (0.5 cm) a la punta de la raíz se detectó una señal de autofluorescencia muy tenue en las células del tejido vascular (Fig. 15J) mientras que en los cortes intermedios (5.0 cm, Fig. 15F) y más alejados (10.0 cm, Fig. 15B) no se detectó señal de autofluorescencia alguna. Con el uso del suero preinmune se detectó una señal de fluorescencia muy tenue en los cortes cercanos (0.5 cm) a la punta de la raíz (Fig. 16) similar a la detectada por autofluorescencia (Fig. 15J). En general, el suero anti-*McPIP2;1* en combinación con los anticuerpos secundarios fluorescentes alexa fluor 488 dieron señales de fluorescencia muy fuertes que identificaron a *McPIP2;1* en los diferentes tipos celulares de la raíz de *M. crystallinum*. Sin embargo, también se detectaron señales tenues o de baja intensidad en algunos tipos celulares, debido posiblemente al reconocimiento de otra u otras AQPs, además de la proteína de *McPIP2;1* que contiene la secuencia del péptido inmunogénico escogido, por el suero anti-*McPIP2;1*. Como se muestra en la Figura 15L, *McPIP2;1* se localizó en células de la epidermis, de la endodermis y del tejido vascular en cortes cercanos (0.5 cm) a la punta de la raíz, corroborando lo descrito por Kirch y cols. (2000), mientras que en los cortes intermedios (5.0 cm) se identificó principalmente en células de la epidermis (Fig. 15H) y en los cortes más alejados (10.0 cm) en células de la epidermis y del tejido vascular (Fig. 15D).

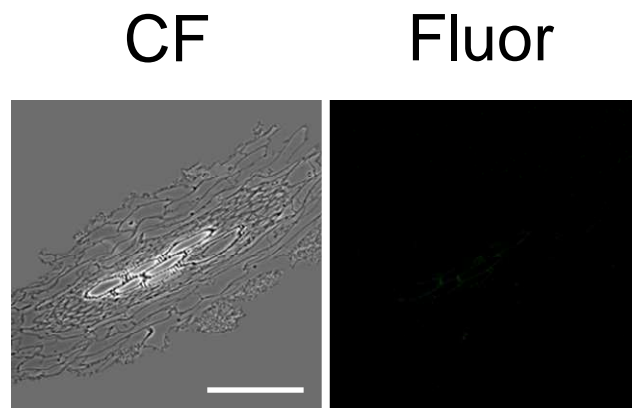




**Figura 15. Localización inmunofluorescente de McPIP2;1 a lo largo del eje de crecimiento de la raíz de *M. crystallinum*.** Las secciones transversales (10  $\mu\text{m}$  de espesor) se obtuvieron de regiones a 0.5 cm, 5.0 cm y 10.0 cm de la punta de raíces de *M. crystallinum*. Los cortes transversales fijados se incubaron primero con el anticuerpo anti-McPIP2;1 y después con el anticuerpo secundario fluorescente alexa fluor 488. La emisión de fluorescencia del anticuerpo secundario se detectó mediante microscopia confocal. El color verde identifica la localización inmunofluorescente indirecta de McPIP2;1. Todas las imágenes de fluorescencia (Fluor) están acompañadas por sus respectivas imágenes de contraste de fases (CF). En **B**, **F** y **J** se muestra la autofluorescencia de los cortes **A**, **E** e **I**, respectivamente, provenientes de plantas control (sin tratar). Las secciones mostradas en **D**, **H** y **L** se obtuvieron de plantas control. Los cortes **N**, **R** y **V** se obtuvieron de plantas tratadas con 200 mM NaCl por 7 días. **P**, **T** y **X** representan los cortes de raíces de plantas tratadas con 200 mM manitol por 48 h. La barra representa 150  $\mu\text{m}$ .

**La salinidad y el estrés osmótico inducen la expresión de *McPIP2;1* en todas las células cercanas a la punta de la raíz de *Mesembryanthemum crystallinum***

Para determinar la localización celular de *McPIP2;1* a lo largo del eje de crecimiento de la raíz de *M. crystallinum* en respuesta a sal (200 mM NaCl por 7 días) y a estrés osmótico (200 mM manitol por 48 h) se realizaron ensayos de localización inmunofluorescente indirecta de *McPIP2;1* con anticuerpos secundarios fluorescentes (alexa fluor 488) en cortes transversales realizados a 0.5 cm, 5.0 cm y 10.0 cm de la punta de la raíz. En respuesta a sal (Fig. 15V) y a estrés osmótico (Fig. 15X), *McPIP2;1* se expresó en todas las células (epidermis, corteza, endodermis, tejido vascular) cercanas (0.5 cm) a la punta de la raíz de *M. crystallinum*. En los cortes intermedios (5.0 cm, Fig. 15R) y más alejados (10.0 cm, Fig. 15N) de la punta de raíces de plantas tratadas con sal se detectó a *McPIP2;1* principalmente en células de la epidermis y del tejido vascular, mientras que en los cortes intermedios (5.0 cm, Fig. 15T) y más alejados (10.0 cm, Fig. 15P) de la punta de raíces de plantas bajo estrés osmótico *McPIP2;1* se identificó principalmente en células de la epidermis.



**Figura 16. Localización inmunofluorescente de *McPIP2;1* a lo largo del eje de crecimiento de la raíz de *M. crystallinum* (control preinmune).** Se muestra la imagen de microscopia de contraste de fases (CF) de una sección transversal (10  $\mu$ m de espesor) representativa de la región cercana (0.5 cm) a la punta de la raíz de *M. crystallinum*. El corte fijado se incubó primero con suero preinmune y después con el anticuerpo secundario fluorescente alexa fluor 488. La emisión de fluorescencia (Fluor) del anticuerpo secundario se registró mediante microscopia confocal. La barra representa 150  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

### Selectividad de transporte de *McPIP2;1*

En este trabajo de investigación mostramos que *McPIP2;1* es una AQP muy eficiente para el transporte de agua, como lo indica el incremento de 14 veces observado en la permeabilidad del agua a través de la membrana plasmática de los ovocitos mediada por esta AQP. Aunado a lo anterior, los ensayos de consumo de solutos radiactivos mostraron que *McPIP2;1* no transporta a los solutos neutros pequeños glicerol y urea, lo que sugiere que *McPIP2;1* es un canal selectivo para el transporte de agua. A nivel estructural, la región aromático/arginina (ar/R) de *McPIP2;1*, formada por los residuos Phe<sup>89</sup>, His<sup>218</sup>, Thr<sup>227</sup> y Arg<sup>233</sup>, también apoya la selectividad de transporte de esta AQP hacia el agua. Se ha reportado que el ensamblaje de dichos residuos de aminoácidos actúa como un filtro de selectividad (Fu y cols., 2000; Sui y cols., 2001) que se encuentra muy conservado en las AQPs ortodoxas o selectivas hacia el transporte del agua (Beitz y cols., 2006). Por lo tanto, la estrechez del canal en la región ar/R podría explicar la impermeabilidad de *McPIP2;1* al glicerol y a la urea. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que *McPIP2;1* pueda transportar algún otro soluto diferente al agua pero no tan grande como el glicerol o la urea, tal como el CO<sub>2</sub>, el cual se ha sugerido que se transporta a través de la AQP *HvPIP2;1* de cebada (Hanba y cols., 2004). Posibilidad que requiere futuros estudios.

### Regulación de la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua por fosforilación

Los resultados obtenidos mediante el sistema de expresión heteróloga en ovocitos muestran claramente que la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua está regulada positivamente por fosforilación mediada por PCA y PCC. Esto se mostró con el uso de los agonistas de la fosforilación 8-Br-AMPC, AO y FMA, los cuales estimularon el transporte de agua, mediado por *McPIP2;1*, a través de la membrana plasmática de los ovocitos. Por el contrario, el uso de los péptidos 14-22 y 20-28, inhibidores de la PCA y de la PCC, respectivamente, disminuyó la permeabilidad osmótica del agua a través de la membrana plasmática de los ovocitos que expresaban a *McPIP2;1*, confirmando que la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua está regulada positivamente por fosforilación. También se encontró que los cambios en la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua debidos a la presencia de dichos agonistas y antagonistas de la fosforilación se correlacionan con los cambios en el estatus de fosforilación de la AQP en la membrana plasmática de los ovocitos provocados por los mismos efectores. El 8-Br-AMPC, el AO y el FMA indujeron la fosforilación de *McPIP2;1* mientras que los péptidos inhibidores de la PCA y de la PCC tuvieron el efecto opuesto. La posibilidad de que los efectos provocados por estos tratamientos se debieran a la expresión diferencial de *McPIP2;1* en la membrana plasmática de los ovocitos se descartó al observarse niveles de expresión similares de esta AQP en la membrana plasmática tanto de ovocitos sin tratar como de ovocitos tratados con los agonistas y antagonistas de la fosforilación mencionados. Los resultados obtenidos y la presencia de motivos de

fosforilación por PCA y PCC en la secuencia de aminoácidos de *McPIP2*;1 sugieren que dichas cinasas actúan directamente sobre esta AQP, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las cinasas actúen de manera indirecta a través de algún intermediario de sus vías de fosforilación.

En contraste con lo bien caracterizada que está en los animales, en las plantas se tiene muy poca información sobre la vía de fosforilación por PCA dependiente de AMPc. En las plantas, hasta el momento, no se tienen reportes de alguna PCA dependiente de AMPc completamente purificada, sin embargo, se han reportado fosforilaciones de proteínas por proteínas cinasas (no identificadas) que dependen o son estimuladas por AMPc en extractos de plantas como la lenteja de agua (*Lemna paucicostata*), el maíz, el cocotero (*Cocos nucifera*), el arroz y la petunia (Newton y Smith, 2004). A nivel molecular se han clonado genes de frijol, arroz, maíz, chícharo (*Pisum sativum*) y *A. thaliana* que presentan cierta homología con el dominio catalítico de la PCA de animales, sin embargo, se desconoce la función de las proteínas codificadas por estos genes (Newton y Smith, 2004). Por el momento, sólo se ha reportado la purificación parcial de una proteína cinasa de petunia con actividad de PCA, la cual fosforila al péptido Kemptide (LRRASLG), el cual es un sustrato sintético de la PCA de animales (Vasconsuelo y Boland, 2007).

Aunque todavía no se ha identificado a una PCA como tal, se tiene evidencia de que en las plantas existe una vía de señalización dependiente de AMPc. Se ha mostrado que el 8-Br-AMPc y la forskolina (compuesto activador de la adenilato ciclasa, AC) inducen la entrada de  $Ca^{2+}$  en células de zanahoria en cultivo. Además, se ha encontrado actividad de AC dependiente de calmodulina en extractos crudos de raíces de alfalfa (*Medicago sativa*; Gehring, 2010). Sin embargo, la evidencia más directa proviene de ensayos de patch-clamp realizados en protoplastos de mesófilo de *Vicia faba* en los cuales se mostró que la corriente saliente de  $K^+$  se incrementa conforme se aumenta la concentración intracelular de AMPc, lo cual no ocurrió cuando se aplicó AMP, GMPc o GMP. Además, se mostró que dicha respuesta estaba modulada por una proteína cinasa dependiente de AMPc no identificada. Aunado a lo anterior, se ha reportado la estimulación de corrientes de  $Ca^{2+}$  por AMPc en células guarda y en células de mesófilo de *A. thaliana* y de *Vicia faba* (Gehring, 2010). Por tanto, de acuerdo con esta evidencia y con nuestros resultados, no se descarta la posibilidad de que en las raíces de *M. crystallinum* exista una vía de señalización dependiente de AMPc que fosforile a *McPIP2*;1, ya sea por medio de una PCA como tal o por medio de alguna otra proteína con propiedades similares a una PCA aún no identificadas.

Así mismo, en las plantas aún no se han identificado homólogos funcionales de la PCC clásica encontrada en animales y hongos, la cual es activada por fosfatidilserina (FS) y diacilglicerol (DAG) a través de un mecanismo dependiente de  $Ca^{2+}$  (Mellor y Parker, 1998). Sin embargo, las plantas poseen unas proteínas cinasas novedosas dependientes de  $Ca^{2+}$  e independientes de calmodulina que no se encuentran en animales ni en hongos, denominadas proteínas cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$  o proteínas cinasas con un dominio tipo calmodulina (PCDC), las cuales se acepta, por lo general, que cumplen con las funciones de una PCC en las plantas, puesto que ambos

tipos de cinasas son activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  y pueden ser estimuladas por fosfolípidos como la FS (Klimecka y Muszynska, 2007).

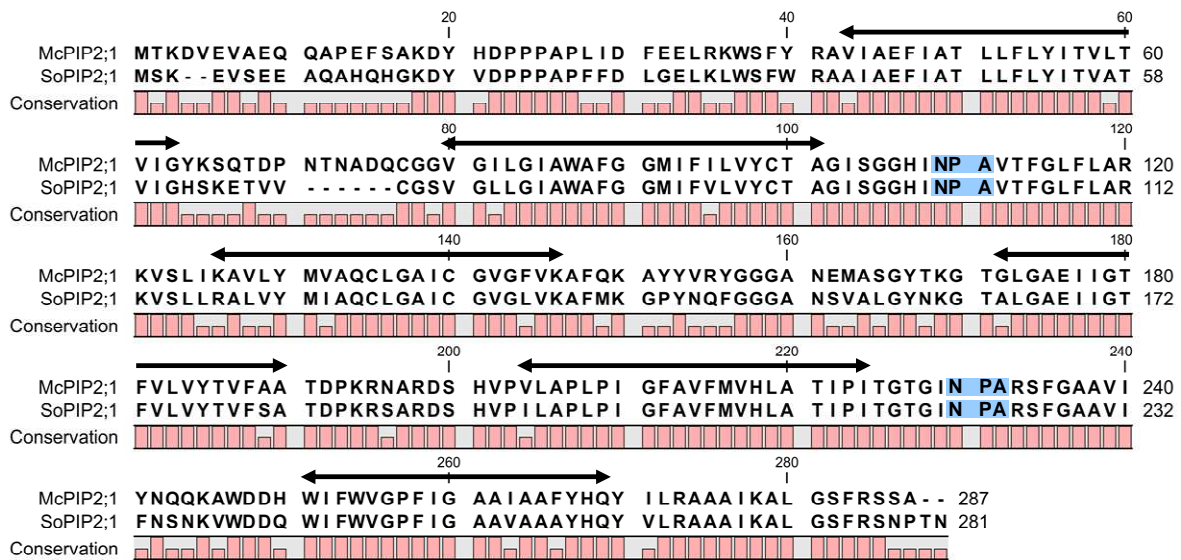
De acuerdo con los seis motivos de fosforilación reconocidos por las PCDC en sus proteínas sustrato reportados hasta el momento (Klimecka y Muszynska, 2007), la AQP *McPIP2;1* presenta cuatro sitios probables de fosforilación por PCDC. Dos de estos sitios, los residuos  $\text{Ser}^{16}$  y  $\text{Ser}^{282}$ , se localizan en motivos de fosforilación susceptibles a ser fosforilados por PCC, mientras que los otros dos sitios, localizados en los residuos  $\text{Ser}^{38}$  y  $\text{Ser}^{123}$ , se encuentran en motivos de fosforilación que pueden ser reconocidos por PCA. Se ha reportado que algunas AQPs de plantas son fosforiladas por PCDC. La *GmNod26* de soya es fosforilada en el residuo  $\text{Ser}^{262}$  por una PCDC asociada con la membrana del simbiosoma (Guenther y cols., 2003), mientras que la  $\alpha$ -TIP localizada en la membrana de la vacuola de almacenamiento de proteínas de las semillas de frijol es fosforilada por una proteína cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (presumiblemente una PCDC) presente en dicha membrana (Johnson y Chrispeels, 1992) y la *SoPIP2;1* de espinaca es fosforilada en el residuo  $\text{Ser}^{274}$  por una PCDC presente en membranas plasmáticas aisladas de hojas (Sjövall-Larsen y cols., 2006). Estas evidencias junto con los resultados obtenidos indican que es muy probable que alguna PCDC localizada en las raíces de *M. crystallinum* actúe sobre *McPIP2;1* y por lo tanto regule su actividad como canal de agua por fosforilación. Hasta el momento sólo se ha identificado una PCDC en las hojas de *M. crystallinum* (*McCPK1*; Chehab y cols., 2004), sin embargo, las PCDC están codificadas por familias multigénicas (hay 34 genes que codifican para PCDC en el genoma de *A. thaliana*), por lo que es muy probable que en *M. crystallinum* se encuentren presentes varias isoformas de PCDC, alguna de las cuales se localice en las raíces y actúe sobre *McPIP2;1*. Un tema de investigación muy interesante que merece estudios posteriores.

### **Función de los residuos $\text{Ser}^{123}$ y $\text{Ser}^{282}$ en la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua**

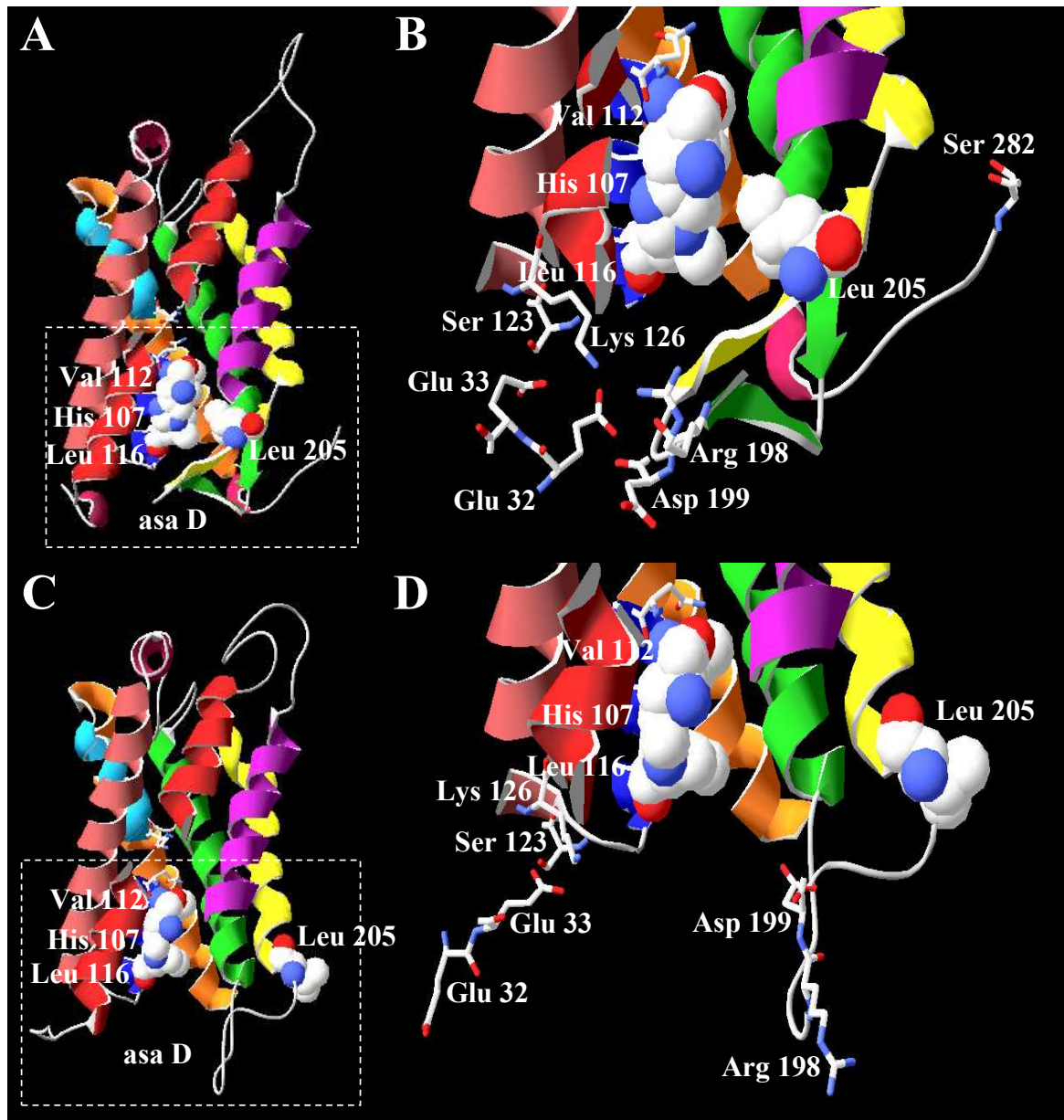
La mutación del residuo  $\text{Ser}^{123}$  inhibió por completo la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua, independientemente de su reemplazo por los aminoácidos alanina (pequeño, no polar), asparagina (polar sin carga) o fenilalanina (grande, no polar). Esto indica que a pesar de los posibles cambios conformacionales en la estructura tridimensional de *McPIP2;1* ocasionados por la inserción de tales aminoácidos en la posición 123 de la estructura primaria de la AQP, la presencia del residuo  $\text{Ser}^{123}$  es esencial para la permeabilidad al agua de *McPIP2;1*. Como se describe en Törnroth-Horsefield y cols. (2006), la fosforilación del residuo  $\text{Ser}^{115}$  de la AQP *SoPIP2;1* de espinaca (correspondiente al residuo  $\text{Ser}^{123}$  de *McPIP2;1*) interrumpe la red de enlaces de hidrógeno que anclan el asa D con el extremo N terminal y, por consiguiente, provoca el desplazamiento del asa D lejos de la entrada citoplásmica del poro, lo que resulta en la abertura del canal de agua. De acuerdo con este mecanismo de abertura y cierre, la ausencia de la  $\text{Ser}^{123}$  en las mutantes *McPIP2;1-S123* prevendría la interrupción de las interacciones entre el asa D y el extremo N terminal de la AQP por algún evento de fosforilación, con lo cual el asa D se mantendría ocluyendo la entrada citoplásmica del

poro en el canal. Este mecanismo se ajusta bien y puede explicar el abatimiento de la permeabilidad al agua observado en las mutantes *McPIP2;1*-S123.

Sin embargo, se ha reportado que la mutación del residuo de serina correspondiente al residuo Ser<sup>123</sup> de *McPIP2;1* disminuye, pero no inhibe por completo, el transporte del agua a través de las AQPs *PvTIP3;1* de frijol (Maurel y cols., 1995), *SoPIP2;1* de espinaca (Johansson y cols., 1998) y *ZmPIP2;1* de maíz (Van Wilder y cols., 2008). Nosotros proponemos que la permeabilidad al agua residual observada en dichas AQPs mutantes se debe probablemente a un taponamiento ineficiente del poro por el asa D debido a que ésta se encuentra presente en la entrada citoplásmica del canal de manera inestable. El modelo estructural de *McPIP2;1*, realizado con base en la estructura cristalizada de la AQP *SoPIP2;1* (76% de identidad con *McPIP2;1* a nivel de aminoácidos, Fig. 17) en su conformación cerrada, reveló que la estabilización del asa D por debajo de la entrada citoplásmica del poro (Fig. 18A), conferida por una red de interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno, involucraría la conexión de los residuos Arg<sup>198</sup> y Asp<sup>199</sup> del asa D con la cadena lateral del residuo Lys<sup>126</sup> del asa B de acuerdo con lo descrito por Törnroth-horsefield y cols. (2006, Fig. 18B).

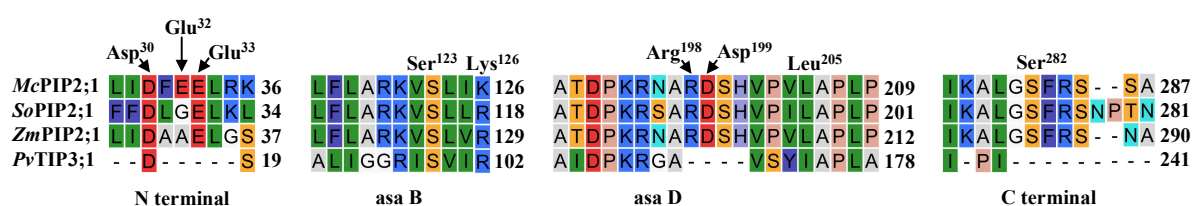


**Figura 17. Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de las AQPs *McPIP2;1* y *SoPIP2;1*.** Los dominios transmembranales están señalados con flechas dobles sobre las secuencias. Las firmas de tres aminoácidos, NPA, características de las AQPs se muestran con un fondo azul pálido. La identidad entre los residuos de aminoácidos de las AQPs *McPIP2;1* y *SoPIP2;1* se muestra como una gráfica de barras de conservación por debajo de las secuencias. El alineamiento de las secuencias se hizo con la aplicación CLC Sequence Viewer.



**Figura 18. Modelos estructurales de *McPIP2;1* en sus conformaciones cerrada y abierta.** Los modelos se construyeron con base en las estructuras cristalizadas de la AQP de espinaca SoPIP2;1 en sus conformaciones cerrada y abierta. A, vista lateral de *McPIP2;1* en su conformación cerrada. El asa D se ubica por debajo de la entrada citoplásmica del canal y acerca al residuo de Leu<sup>205</sup> con los residuos His<sup>107</sup>, Val<sup>112</sup> y Leu<sup>116</sup> (esferas sólidas de van der Waals) formando una barrera hidrofóbica que ocluye el canal. B, acercamiento del recuadro en el panel A. El asa D se encuentra estabilizada por debajo de la entrada citoplásmica del canal mediante la interacción de los residuos Arg<sup>198</sup> y Asp<sup>199</sup> con los residuos Lys<sup>126</sup> y Glu<sup>32</sup> (bastones) del extremo N-terminal. C, vista lateral de *McPIP2;1* en su conformación abierta. El asa D se encuentra desplazada de la entrada citoplásmica del canal y aleja al residuo Leu<sup>205</sup> de los residuos His<sup>107</sup>, Val<sup>112</sup> y Leu<sup>116</sup> (esferas sólidas de van der Waals) evitando la formación de la barrera hidrofóbica. D, acercamiento del recuadro en el panel C. Los residuos de aminoácidos del asa D no interactúan con los residuos de aminoácidos del extremo N-terminal, evitando el taponamiento del canal.

Aunado a lo anterior, el residuo Lys<sup>126</sup> podría formar enlaces de hidrógeno con el residuo Glu<sup>33</sup> localizado en el extremo N-terminal, el cual se propone que liga a un catión divalente (p.e. Ca<sup>2+</sup>) que también estaría implicado en el anclaje del asa D con el extremo N terminal de la AQP (Fig. 18B). El análisis de las secuencias de aminoácidos de las AQPs *PvTIP3;1*, *SoPIP2;1* y *ZmPIP2;1* reveló la ausencia de un aminoácido ácido en la posición correspondiente con el residuo Glu<sup>32</sup> de *McPIP2;1* (Fig. 19). Por lo tanto, la presencia del ácido glutámico en la posición 32 (Figs. 18B y 18D) confiere a *McPIP2;1* una carga negativa extra que podría estar involucrada en la coordinación del catión divalente o en su enlace con el residuo Lys<sup>126</sup> por medio de puentes de hidrógeno, lo que provocaría una estabilización más fuerte del anclaje del asa D con el extremo N-terminal de la AQP y tendría como resultado el cierre hermético del canal. Este mecanismo podría explicar la inhibición total de la permeabilidad al agua de *McPIP2;1* cuando se mutó en el residuo Ser<sup>123</sup> y que no se observó en las AQPs *PvTIP3;1*, *SoPIP2;1* y *ZmPIP2;1* cuando éstas se mutaron en el residuo de serina correspondiente. Además, la estructura cristalizada de la AQP5 de humano reveló que el residuo Ser<sup>83</sup> en el asa B (correspondiente con el residuo Ser<sup>123</sup> de *McPIP2;1*) interactúa con el extremo C terminal de la AQP mediante enlaces de hidrógeno directos o mediados por agua, anclando el extremo C terminal con el asa B (Horsefield y cols., 2008). Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que el residuo Ser<sup>123</sup> tenga una función estructural en el mecanismo de abertura y cierre de *McPIP2;1* cuando no se encuentra fosforilado. Es necesario realizar estudios posteriores para corroborar estas hipótesis. De manera interesante, la mutante *McPIP2;1*-S123A se fosforila *in vitro*. Por lo tanto, la fosforilación de *McPIP2;1* en residuos de aminoácidos distintos a la Ser<sup>123</sup> podría tener una función adicional además de controlar la permeabilidad al agua de la AQP.



**Figura 19. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las AQPs *McPIP2;1*, *SoPIP2;1*, *ZmPIP2;1* y *PvTIP3;1*.** Alineamiento de segmentos de las regiones N y C terminales y de las asas B y D (con seis residuos de aminoácidos de la hélice 5 añadidos). Las primeras dos letras del nombre de las AQPs se refieren a la especie de planta de la cual provienen (*Mc*, *Mesembryanthemum crystallinum*; *So*, *Spinacia oleracea*, espinaca; *Zm*, *Zea mays*, maíz; *Pv*, *Phaseolus vulgaris*, frijol). Los residuos de aminoácidos se colorearon de acuerdo con las propiedades de sus cadenas laterales: alifáticos grandes (verde), alifáticos pequeños (gris), básicos (azul), ácidos (rojos), no aromáticos con grupos hidroxilo (naranja) y aromáticos (royal). Se indican los residuos de aminoácidos involucrados en el anclaje del asa D con el asa B y el extremo N terminal. Ser<sup>123</sup> y Ser<sup>282</sup>: sitios predichos de fosforilación. El alineamiento de las secuencias se hizo con la aplicación CLC Sequence Viewer.



La mutación del residuo Ser<sup>282</sup> también afectó negativamente la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua, con un 51.9% de inhibición, lo que demuestra la participación de dicho residuo en los mecanismos de permeabilidad al agua de esta AQP. De manera inesperada se observó un incremento en los niveles de fosforilación *in vitro* de la mutante *McPIP2;1-S282A* en comparación con la forma silvestre. Este resultado sugiere que la ausencia del residuo Ser<sup>282</sup> probablemente ocasionó un cambio de conformación en la estructura de la AQP que provocó la exposición de motivos de fosforilación originalmente no expuestos, localizados en el interior de la proteína. El nivel de fosforilación de la mutante *McPIP2;1-S282A* se redujo en presencia de los péptidos inhibidores de PCA y de PCC, lo que sugiere que ambas cinasas están involucradas en el incremento de fosforilación observado.

En cuanto a la reducción (51.9%) de la permeabilidad al agua mostrada por las mutantes *McPIP2;1-S282*, ésta se podría deber a una abertura parcial del canal. De acuerdo con la estructura cristalizada de la AQP *SoPIP2;1* en su conformación cerrada (Törnroth-Horsefield y cols., 2006), la interacción de la Ser<sup>282</sup>, localizada en el extremo C terminal de *McPIP2;1*, con los residuos Pro<sup>207</sup> y Leu<sup>208</sup> de la hélice transmembranal 5 de un monómero adyacente (las AQPs adoptan una conformación tetramérica en las membranas) estabilizaría la barrera hidrofóbica, compuesta por los residuos His<sup>107</sup>, Val<sup>112</sup> y Leu<sup>116</sup> del asa B y Leu<sup>205</sup> de la hélice transmembranal 5, que se forma cuando el asa D se encuentra ocluyendo la entrada citoplásmica del canal (Figs. 18A y 18B). Con base en el mecanismo de abertura y cierre de la AQP *SoPIP2;1* propuesto por Törnroth-Horsefield y cols. (2006), la fosforilación del residuo Ser<sup>282</sup> de *McPIP2;1* desestabilizaría la barrera hidrofóbica, desplazando a la Leu<sup>205</sup> de la entrada citoplásmica del poro (Figs. 18C y 18D), y por tanto, tendría como resultado la abertura del canal. En las mutantes *McPIP2;1-S282*, la fosforilación del residuo Ser<sup>123</sup> podría ocasionar el desplazamiento del asa D de la entrada citoplásmica del canal por el mecanismo descrito anteriormente, lo que tendría como consecuencia la abertura del canal. Sin embargo, el residuo Leu<sup>205</sup> en la hélice transmembranal 5 de dichas mutantes posiblemente no se encuentra desplazado por completo de la entrada citoplásmica del poro debido a la ausencia de fosforilación en el residuo Ser<sup>282</sup>, razón por la cual la barrera hidrofóbica podría permanecer bloqueando de manera parcial la entrada del canal. Este modelo se ajusta muy bien a los resultados obtenidos y podría explicar la disminución de la permeabilidad osmótica del agua mostrada por las mutantes *McPIP2;1-S282*. No obstante, se ha reportado que la mutación del residuo de serina correspondiente al residuo Ser<sup>282</sup> de *McPIP2;1* localizado en el extremo C terminal de las AQPs *SoPIP2;1* (Johansson y cols., 1998) y *ZmPIP2;1* (Van Wilder y cols., 2008) no afecta el transporte de agua por esas AQPs cuando se expresaron en el sistema de los ovocitos. Posiblemente, algunos residuos de aminoácidos específicos, como es el caso del residuo Glu<sup>32</sup> mencionado anteriormente, están involucrados particularmente en el mecanismo de abertura y cierre de ciertas AQPs de plantas, un tópico que merece ser estudiado posteriormente.

Por otra parte, la mutante doble *McPIP2;1-S123/282A* mostró una inhibición total de permeabilidad al agua, corroborando la esencialidad del residuo Ser<sup>123</sup> para la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua. Además, a pesar de verse disminuida significativamente, la fosforilación de la doble mutante no se suprimió por completo, lo

que sugiere que la fosforilación de *McPIP2;1* puede tener una función adicional además de controlar la permeabilidad al agua de la AQP. Se ha reportado que la mutación de la AQP *AtPIP2;1* de *A. thaliana* en el residuo Ser<sup>283</sup> (correspondiente al residuo Ser<sup>285</sup> de *McPIP2;1* y conservado en las PIP2s) afecta su localización en la membrana plasmática (Prak y cols., 2008). Por lo tanto, la fosforilación podría tener una función dual en las AQPs de las plantas, controlar su actividad como canales de agua y regular su tráfico hacia las membranas subcelulares.

### **Localización subcelular de *McPIP2;1* durante el crecimiento y desarrollo de las raíces de *M. crystallinum* y en respuesta a salinidad y estrés osmótico**

Bajo condiciones normales de crecimiento y desarrollo de las raíces de *M. crystallinum* se encontró a *McPIP2;1* en tres grupos de membranas celulares: RE/Golgi, TP y MP, lo que sugiere la participación de esta AQP en el transporte del agua a través de dichas membranas para regular la homeostasis osmótica del RE o del complejo de Golgi así como de la vacuola y del citoplasma de las células de la raíz. Aunque no se logró determinar de manera precisa si *McPIP2;1* se localiza en membranas del RE o del complejo de Golgi o de ambos, tanto el RE como el complejo de Golgi son organelos celulares delimitados por membranas, y por tanto, deben tener la capacidad de regular su volumen durante el crecimiento y desarrollo de las células de la raíz para que puedan llevar a cabo sus funciones dentro de las células. La presencia de *McPIP2;1* en estos organelos podría ser importante para regular los flujos de agua a través de sus membranas y mantener, de esta manera, su homeostasis osmótica. Mediante la expresión de fusiones traduccionales con la proteína verde fluorescente en protoplastos de cultivos celulares en suspensión de *A. thaliana* se ha localizado a la AQP *AtNIP2;1* (Mizutani y cols., 2006) y a las tres SIPs (Ishikawa y cols., 2005) de *A. thaliana* específicamente en el RE. Mediante ensayos de expresión heteróloga en células de levadura en combinación con espectrofotometría de flujo estacionado se ha demostrado que algunas de ellas median el transporte de agua, sin embargo, como en el caso de *McPIP2;1*, se desconoce la función de dichas AQPs como canales de agua cuando se localizan en la membrana del RE. Por otra parte, no se ha reportado la presencia específica de alguna AQP de plantas en el complejo de Golgi.

Además de ser organelos celulares delimitados por membranas, tanto el RE como el complejo de Golgi forman parte de la vía de secreción de las células a través de la cual todas las proteínas (solubles o de membrana) son dirigidas a su localización subcelular específica (membranas o lumen de los organelos; Fuji y cols., 2009), y por consiguiente, es posible que la presencia de *McPIP2;1* en membranas del RE o del complejo de Golgi se deba al proceso de tráfico vesicular de esta AQP para alcanzar el TP o la MP. Se ha mostrado que el tráfico de las proteínas de membrana desde el RE hacia el complejo de Golgi está determinado, en parte, por la presencia de motivos diácidos (D/E-X-D/E) en la estructura primaria de las proteínas, los cuales, en el caso de las proteínas de animales, se ha mostrado que son reconocidos por el componente Sec24 del complejo de proteínas de cubierta II (COPII, de sus siglas en inglés) para que se lleve a cabo el reclutamiento de las proteínas en vesículas de transporte (Mikosch y Homann, 2009). En el caso particular de las AQPs de plantas se ha mostrado la

funcionalidad de los motivos diacídicos para el tráfico de las AQPs *ZmPIP2;4* y *ZmPIP2;5* de maíz (Zelazny y cols., 2009) y *AtPIP2;1* de *A. thaliana* (Sorieul y cols., 2011) hacia la MP. De manera interesante, *McPIP2;1* presenta dos motivos diacídicos en su extremo N-terminal, Asp<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Glu<sup>6</sup> y Asp<sup>30</sup>-Phe<sup>31</sup>-Glu<sup>32</sup>, el primero de los cuales es idéntico y se encuentra en la misma posición que el motivo diacídico de la AQP *AtPIP2;1* cuya funcionalidad ya se ha demostrado. Por lo tanto, es posible que el hecho de que se haya encontrado a *McPIP2;1* en el RE o en el complejo de Golgi se deba al tráfico de esta AQP hacia el TP o hacia la MP.

La localización de *McPIP2;1* en el TP podría tener dos funciones. Una de ellas sería la de participar en la elongación de las células de las raíces. El crecimiento de las células vegetales por expansión celular está dirigido por un incremento en la presión de turgor intracelular generado por el transporte y acumulación de sustancias osmóticamente activas hacia el interior de la vacuola seguido por el consumo pasivo de agua a través de la MP y del TP (Salisbury y Ross, 1992c). De manera interesante, se ha reportado que las TIP1s de *A. thaliana*, maíz y rábano, las cuales tienen actividades de transporte de agua muy altas, se encuentran abundantemente en células en expansión (Wudick y cols., 2009). A nivel funcional, se ha mostrado que la sobre-expresión de las AQPs TIP1 de coliflor (Reisen y cols., 2003) y *NtTIP1;1* de tabaco (Okubo-Kurihara y cols., 2009) en células en suspensión y en protoplastos de tabaco, respectivamente, incrementa la superficie celular y la expansión de las células hasta en un 24%. A nivel de la planta completa se ha mostrado que la sobre-expresión de la AQP *PgTIP1;1* de *Panax ginseng* en *A. thaliana* incrementa el crecimiento tanto de los órganos vegetativos (raíces y hojas) como de los órganos reproductores (semillas) de las plantas transgénicas, lo que se debe, en parte, a la presencia de células más largas (Lin y cols., 2007). Por lo tanto, *McPIP2;1* podría estar contribuyendo, junto con otras AQPs localizadas en el TP, con el crecimiento de las células de las raíces de *M. crystallinum* por alargamiento.

La otra posible función sería la de regular la homeostasis osmótica tanto del citoplasma como de la vacuola misma. Más del 90% del volumen de las células vegetales diferenciadas puede estar ocupado por una vacuola central, y por consiguiente, el citoplasma está confinado a una región muy estrecha entre la vacuola y la MP, y queda, además, en medio de la vía de flujo de agua entre la vacuola y el espacio extracelular (Wudick y cols., 2009). El citoplasma es un compartimiento esencial para el buen funcionamiento de las células debido a las reacciones metabólicas que se llevan a cabo en él, por ejemplo la glicólisis, por lo que cualquier fluctuación en su volumen podría afectar la realización de dichas reacciones. En casos de flujos de agua abundantes y repentinos, como aquellos ocasionados por cambios en la transpiración de las plantas, se podrían lograr cambios mínimos en el volumen del citoplasma de las células si la permeabilidad del agua a través del TP es mucho mayor a la de la MP. Se ha mostrado que el transporte del agua a través de vesículas de TP es hasta 100 veces mayor al transporte de agua a través de vesículas de MP (Maurel y cols., 1997), lo cual podría deberse a una diferencia en la cantidad de AQPs presentes en dichas vesículas. Por lo tanto, la AQP *McPIP2;1* localizada en el TP podría estar participando en la toma o expulsión de agua por la vacuola para tratar de mantener el volumen del citoplasma lo más constante posible cuando ocurran cambios en los flujos

intra- e intercelulares de agua. Así mismo, la vacuola es un organelo celular delimitado por membrana, por lo que *McPIP2;1* podría también estar implicada en la regulación de la homeostasis osmótica de éste organelo.

En el caso de su localización en la MP, la función de *McPIP2;1* en esta membrana podría ser, al igual que en la vacuola, la de regular la homeostasis osmótica del citoplasma mediante la regulación del flujo del agua entre éste compartimiento y el espacio extracelular. Así mismo, la presencia de *McPIP2;1* en la MP de las células de las raíces sugiere que esta AQP podría estar participando en la toma de agua por las raíces de *M. crystallinum*. De manera interesante, encontramos a *McPIP2;1* fosforilada en la MP. Esta evidencia en conjunto con los resultados obtenidos de los ensayos funcionales sugieren que *McPIP2;1* podría encontrarse permanentemente activa en la MP de las células de la raíz, sin embargo, la fosforilación de la AQP también podría estar regulando su tráfico vesicular hacia la MP. En mamíferos se ha mostrado que la fosforilación de la AQP2 en el residuo Ser<sup>256</sup> por una PCA dispara el tráfico de esta AQP desde vesículas intracelulares hacia la MP apical de las células conductoras del riñón mediante mecanismos que involucran la interacción de las vesículas que contiene a la AQP2 con el citoesqueleto (Brown y cols., 1998) y que además dependen de la estequiometría de los monómeros fosforilados (Kamsteeg y cols., 2000). En el caso de las plantas, la expresión de mutantes en células de raíces transgénicas de *A. thaliana* ha mostrado que la fosforilación del residuo Ser<sup>283</sup> de la AQP *AtPIP2;1* es necesaria para el tráfico de ésta AQP hacia la MP (Prak y cols., 2008). El residuo de serina localizado en la posición 283 de la secuencia de aminoácidos de *AtPIP2;1* se encuentra muy conservado en la subfamilia de las PIP2s, y en el caso de *McPIP2;1* correspondería al residuo Ser<sup>286</sup>, el cual se predice que puede ser fosforilado por PCA. Por lo tanto, de acuerdo con estos antecedentes, es probable que la fosforilación de *McPIP2;1* en el residuo Ser<sup>286</sup> sea necesaria para el tráfico de esta AQP hacia la MP.

Por otra parte, el hecho de que no se haya encontrado fosforilada a *McPIP2;1* en las membranas del RE/Golgi y del TP no significa, necesariamente, que esta AQP se encuentre inactiva en dichas membranas. El proceso de abertura y cierre de las AQPs está determinado por varios mecanismos, entre los que se incluye, además de la fosforilación, la regulación por pH y por calcio (Chaumont y cols., 2005). Por consiguiente, podría ser que en las membranas del RE/Golgi y de la vacuola (TP) la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua se encuentre regulada principalmente por cambios en el pH o por cationes divalentes como el calcio más que por fosforilación. Sin embargo, tampoco se descarta la posibilidad de que la fosforilación de *McPIP2;1* en las membranas del RE/Golgi y de la vacuola ocurra solamente bajo ciertas condiciones. Por lo tanto, la determinación de la funcionalidad de *McPIP2;1* como canal de agua en las membranas del RE/Golgi, del TP y de la MP es primordial para asignarle una función celular a esta AQP.

Después de 7 días de tratamiento con sal, *McPIP2;1* se localizó subcelularmente en los mismos tipos de membranas (RE/Golgi, TP y MP) en los cuales se encontró en ausencia de estrés, lo que indicaría que no hubo cambios en la distribución subcelular de *McPIP2;1* bajo condiciones salinas. Sin embargo, como se desconoce la distribución subcelular de *McPIP2;1* a tiempos cortos (minutos a horas) después del tratamiento con

sal no se puede asegurar que dicho tratamiento no haya provocado cambios en la localización subcelular de esta AQP en algún momento. Se ha reportado que el tratamiento de plantas transgénicas de *A. thaliana* con sal (100 mM de NaCl) induce la internalización de PIP1s y PIP2s y de las AQPs AtTIP1;1 (Boursiac y cols., 2005) y AtPIP2;1 (Prak y cols. 2008) en cuerpos esféricos intracelulares no identificados en células de la raíz, sin embargo, como el tiempo de tratamiento en estos ensayos fue muy corto (2 horas), lo más probable es que la redistribución observada se deba principalmente al estrés osmótico inducido por el tratamiento con sal. No obstante los posibles cambios que hayan o no ocurrido a tiempos cortos, después de 7 días bajo condiciones salinas McPIP2;1 se localizó en las mismas membranas subcelulares en las cuales se encontró en raíces de plantas sin estresar, lo que sugiere que la presencia de McPIP2;1 en dichas membranas podría ser fundamental para el funcionamiento de la células mediante las actividades que se discuten en los apartados anteriores.

En respuesta a sal se observó un aumento en los niveles de proteína de McPIP2;1 a nivel subcelular, confirmando lo reportado por Kirch y cols. (2000). Aún sin ser un análisis cuantitativo, en los ensayos de separación de los microsomas de raíces tratadas con sal por medio de gradientes continuos de sacarosa es evidente el incremento en los niveles de proteína de McPIP2;1 a nivel subcelular en respuesta a sal, sin embargo, como se discute en el apartado de resultados con éste método no se logró determinar la localización subcelular precisa de esta AQP. Sin embargo, el fraccionamiento de los microsomas de raíces tratadas con sal por EZFL permitió la separación entre sí de tres grupos de membranas, RE/Golgi, TP y MP, en los cuales se identificó a McPIP2;1. En el grupo de fracciones con membranas de RE/Golgi no se observó un cambio evidente en la abundancia de la proteína de McPIP2;1 bajo condiciones salinas en comparación con la abundancia de esta AQP en dichas membranas bajo condiciones no estresantes. Sin embargo, en el grupo de membranas con MP, y principalmente en el grupo de membranas con TP se incrementó el número de fracciones con proteína de McPIP2;1 bajo condiciones de salinidad en comparación con el número de fracciones obtenidas para dichos grupos de membranas bajo condiciones no estresantes. Estos resultados indican que en respuesta a sal aumenta la abundancia de la proteína de McPIP2;1 en la MP y, principalmente, en el TP. El aumento de los niveles de proteína de McPIP2;1 en la MP y en el TP sugiere que esta AQP podría estar participando en la toma de agua por las raíces y en la regulación de la homeostasis osmótica tanto del citoplasma como de la vacuola durante el proceso de recuperación de la planta después del estrés salino. En las primeras horas y días después del tratamiento con sal, las hojas de *M. crystallinum* pierden turgor (se marchitan), lo que significa que la planta perdió agua, sin embargo, a los 7 días después del tratamiento, las hojas se encuentran de nuevo turgentes, de hecho su contenido relativo de agua es similar al de las hojas de plantas sin estresar (datos no mostrados), lo que indica que recuperaron el agua perdida durante las primeras horas de estrés. Por lo tanto, el aumento de la abundancia de McPIP2;1 en el TP y en la MP bajo condiciones salinas ayudaría a que tanto la toma de agua por las raíces, como la regulación de la homeostasis osmótica del citoplasma y de la vacuola, sean más rápidas y eficientes durante la recuperación de la planta cuando el estrés desaparece.

Aunado a lo anterior, encontramos que bajo condiciones salinas aumenta el estado de fosforilación de *McPIP2;1* en la MP. Esta evidencia sugiere que en respuesta a sal se incrementa la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua cuando se localiza en la MP. Sin embargo, como se menciona en párrafos anteriores, la fosforilación de *McPIP2;1* también podría estar afectando su tráfico hacia la MP. Posiblemente, el aumento en el estado de fosforilación de *McPIP2;1* observado bajo condiciones salinas indica una mayor eficiencia en el tráfico de esta AQP hacia la MP, o bien, que tanto la actividad como el tráfico de *McPIP2;1* hacia la MP se incrementaron bajo condiciones de salinidad, para garantizar una recuperación más rápida y eficiente de la planta cuando desaparece el estrés, ya que *McPIP2;1* podría estar participando tanto en la toma de agua por las raíces como en la regulación osmótica del citoplasma. Por el contrario, se ha reportado que a tiempos cortos (4 h) después de un tratamiento salino disminuye en un 30 % el nivel de fosforilación del residuo Ser<sup>283</sup> de la AQP *AtPIP2;1* en las raíces de *A. thaliana* (Prak y cols., 2008), lo que indicaría una disminución en la actividad de ésta AQP como canal de agua y explicaría la disminución de la permeabilidad al agua mostrado por dichas raíces a tiempos cortos cuando son tratadas con sal. La disminución de la fosforilación de las AQPs localizadas en las raíces de las plantas a tiempos cortos después de un estrés salino u osmótico podría ser un mecanismo de supervivencia de las plantas. En respuesta a un estrés salino y osmótico las plantas tienden a perder agua hacia el suelo a través de las raíces en cuestión de minutos u horas, por lo que la disminución del estado de fosforilación de las AQPs localizadas en las raíces serviría para disminuir o evitar dicha pérdida de agua, ya que se disminuiría o inhibiría la actividad de estas AQPs como canales de agua. Posiblemente éste sea el caso también para *McPIP2;1*.

En el caso del estrés osmótico también se hizo evidente un incremento en los niveles de proteína de *McPIP2;1* a nivel subcelular cuando los microsomas de raíces de *M. crystallinum* bajo estrés osmótico (200 mM manitol o sorbitol) se separaron mediante gradientes continuos de sacarosa. Desafortunadamente, mediante el sistema de EZFL no se logró separar a los microsomas de raíces bajo estrés osmótico en los tres grupos de membranas subcelulares separados entre sí (RE/Golgi, TP y MP) obtenidos tanto de raíces de plantas sin tratar como de raíces de plantas tratadas con sal. Por esta razón no se puede establecer con precisión la localización subcelular de *McPIP2;1* bajo estrés osmótico. Sin embargo, en las fracciones microsomales proveniente de raíces bajo estrés osmótico y separadas mediante el sistema de EZFL se observó un aumento en los niveles de proteína de *McPIP2;1* en comparación con aquellos observados en las fracciones microsomales obtenidas de plantas sin tratar, lo que corrobora el aumento de los niveles de proteína de *McPIP2;1* a nivel subcelular en respuesta a estrés osmótico observados a partir de gradientes continuos de sacarosa. El aumento de los niveles de proteína de *McPIP2;1* a nivel subcelular bajo estrés osmótico sugiere que esta AQP podría estar participando en la toma de agua por las raíces y en la consiguiente regulación de la homeostasis osmótica del citoplasma o de los organelos de las células de la raíz una vez que se haya aliviado el estrés. En las primeras horas después de impuesto, el estrés osmótico provocó la pérdida de turgor (marchitamiento) de las hojas de *M. crystallinum*, sin embargo, la determinación del contenido relativo de agua de las hojas mostró que éste parámetro, relacionado con la hidratación de dichos órganos, disminuyó aproximadamente un 20% a las 24 h después del tratamiento y se mantuvo

en los mismos niveles hasta las 48 h (datos no mostrados). Este mantenimiento del contenido relativo de agua en las hojas a un nivel constante sugiere que la planta está conteniendo de manera efectiva contra el estrés osmótico impuesto, lo cual está asociado, muy probablemente, con la producción y acumulación de solutos compatibles en la planta. Se ha reportado que en respuesta a estrés osmótico los solutos prolina y D-pinitol se acumulan en grandes cantidades tanto en las raíces como en las hojas de *M. crystallinum* (Adams y cols., 1998), los cuales se sugiere actúan como osmolitos para llevar a cabo el proceso de ajuste osmótico y evitar la pérdida de agua o favorecer la toma de ésta por las raíces bajo dicho estrés. Por lo tanto, el aumento de los niveles de proteína de McPIP2;1 a nivel subcelular después de 48 h de estrés osmótico podría ser parte de los mecanismos de preparación de la planta para una vez aliviado el estrés ésta pueda tomar agua de manera rápida y eficiente a través de las raíces y a la vez pueda también regular la homeostasis osmótica del citoplasma o de los organelos en las células de la raíz.

### **Distribución celular de McPIP2;1 a lo largo de la raíz primaria de *M. crystallinum* bajo condiciones de salinidad y estrés osmótico**

A partir de las imágenes de microscopía confocal obtenidas de los ensayos de localización inmunofluorescente en cortes transversales realizados a 0.5 cm, 5.0 cm y 10.0 cm de la punta de la raíz primaria de *M. crystallinum* se puede determinar la localización celular de McPIP2;1 a lo largo de dicho órgano. La localización particular de McPIP2;1 en ciertos tipos celulares a lo largo de la raíz nos puede indicar, tomando en cuenta los análisis funcionales y de distribución subcelular de dicha AQP realizados en este trabajo, cuales serían las posibles funciones fisiológicas que tendría esta AQP en la raíz de *M. crystallinum*.

El análisis de la distribución celular de McPIP2;1 a lo largo del eje de crecimiento de las raíces de *M. crystallinum* mostró que en plantas adultas (6 semanas de edad) esta AQP se localiza en células de la epidermis tanto en la región cercana o apical (0.5 cm) como en la región intermedia (5.0 cm) y distal (10.0 cm) de la punta. Como la epidermis es el tejido periférico de la raíz que se encuentra en contacto directo con el suelo (o con solución nutritiva en nuestros experimentos) esta evidencia sugiere que McPIP2;1 podría estar involucrada en la absorción del agua por las raíces y que, además, dicha absorción se podría estar llevando a cabo a todo lo largo de la raíz. Mediante el uso de la cámara de presión para medir la conductancia hidráulica de segmentos de raíces (con la punta intacta) de diferente tamaño se ha demostrado que la absorción del agua por las raíces del lupino azul (*Lupinus angustifolius*) y del lupino amarillo (*Lupinus luteus*) se lleva a cabo de manera uniforme a lo largo del eje longitudinal de la raíz (Bramley y cols., 2009), lo cual podría también estar ocurriendo en las raíces de *M. crystallinum*. Además, la localización de McPIP2;1 en células de la endodermis y en vasos del xilema en la región cercana a la punta sugiere que esta AQP puede estar participando en el transporte radial del agua a través de la vía célula-a-célula (Fig. 2) en dicha zona para que esta alcance los vasos conductores del xilema que la van a conducir y distribuir a la parte aérea de la planta. La medición de la conductancia hidráulica de segmentos de raíz (con la punta intacta) de diferente tamaño

mediante sonda o cámara de presión ha mostrado que la absorción del agua por las raíces de plántulas de maíz (Frensch y cols., 1996) y de trigo (Bramley y cols., 2009) no se lleva a cabo de manera uniforme a lo largo de su eje de crecimiento, sino que ocurre principalmente en la región apical. Por lo tanto, la presencia de *McPIP2;1* en células de la epidermis y de la endodermis, así como en vasos del xilema cercanos a la punta de la raíz se podría deber a que en ésta zona se lleva a cabo, preferentemente, la toma de agua por las raíces de *M. crystallinum*. Estos resultados también sugieren que la absorción del agua preferentemente en la zona apical de la raíz podría ser uno de los mecanismos que utilizan las halófitas para ser capaces de crecer en suelos salinos y secos con baja disponibilidad de agua. El hecho de que no se haya encontrado a *McPIP2;1* en todos los tipos celulares de la raíz sugiere que otras AQPs podrían estar participando, de manera conjunta con *McPIP2;1*, en la regulación y transporte radial del agua a través de las raíces de *M. crystallinum*. Así mismo, no se descarta la posibilidad de que *McPIP2;1* pudiera estar participando en el proceso de elongación de las células de la epidermis y de la endodermis cuando se localiza en la región apical, ya que la zona de elongación de las raíces se localiza, por lo general, en los primeros 10 mm a partir de la punta.

Bajo condiciones salinas se encontró a *McPIP2;1* en células de la epidermis y en vasos del xilema tanto en la región cercana (0.5 cm) como en la región intermedia (5.0 cm) y distal (10.0 cm) de la punta de la raíz de *M. crystallinum*, lo que sugiere que *McPIP2;1* podría estar participando en la absorción del agua por las raíces y en la carga de ésta en el xilema para su posterior distribución hacia la parte aérea de la planta como parte de los mecanismos de tolerancia de la planta a la salinidad. Aunado a lo anterior, la localización de *McPIP2;1* en células de la epidermis a lo largo de la raíz sugiere que la toma de agua se podría estar llevando a cabo a lo largo de dicho órgano. Sin embargo, en la región apical de la raíz se encontró a *McPIP2;1* también en células de la corteza y de la endodermis. Por tanto, la distribución celular tan amplia de *McPIP2;1* en la zona cercana a la punta de la raíz sugiere que posiblemente en esta región se lleva a cabo, principalmente, la absorción del agua por las raíces de *M. crystallinum* durante la etapa de recuperación de la planta cuando ésta ha contendido exitosamente contra el estrés salino. Como se menciona anteriormente, el tratamiento con sal induce la pérdida de turgor (marchitamiento) en las hojas de *M. crystallinum* en las primeras horas y par de días, sin embargo, a los 7 días después del tratamiento las hojas recuperaron su turgor y su contenido relativo de agua a niveles similares al de las hojas de plantas sin estresar (datos no mostrados), lo que indica que recuperaron el agua perdida durante las primeras horas de estrés. Precisamente, uno de los mecanismos de tolerancia de *M. crystallinum* a la salinidad es el ajuste osmótico mediante el cual la planta trata de disminuir su potencial hídrico para evitar la pérdida de agua hacia el suelo a través de las raíces así como para favorecer la toma de ésta cuando desaparece el estrés. Se ha mostrado que en respuesta a sal ocurre la acumulación de prolina y principalmente de polioles (ononitol y pinitol) tanto en las raíces como en las hojas de *M. crystallinum* (Thomas y Bohnert, 1993), y particularmente en las hojas se ha mostrado también la acumulación de inositol y de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Ishitani y cols., 1996; Adams y cols., 1998), los cuales se propone que actúan como osmolitos durante el proceso de ajuste osmótico. Por lo tanto, *McPIP2;1* podría estar participando en la absorción del agua por las raíces y en la carga de esta



en el xilema en respuesta al proceso de ajuste osmótico realizado por la planta para tolerar el ambiente salino.

Por otra parte, el flujo radial del agua y de los solutos a través de la vía apoplástica está regulado por la diferenciación de bandas de Caspari tanto en la endodermis como en la exodermis de las raíces (Fig. 2). Estas bandas envuelven a las células de dichos tejidos y, como están constituidas por los compuestos hidrofóbicos lignina y suberina, el agua y los solutos se ven forzados a atravesar dichas capas celulares a través de su MP (vía célula-a-célula, Steudle y Peterson, 1998; Krishnamurthy y cols., 2009). Se ha reportado que el estrés salino induce la deposición de suberina en las bandas de Caspari de las raíces de ricino (*Ricinus communis*, Schreiber y cols., 2005), maíz (Karahara y cols., 2004) y algodón (Reinhardt y Rost, 1995), y en el caso del arroz se ha demostrado que la suberización de las raíces esta correlacionada directamente con la tolerancia de las plantas a la salinidad (Krishnamurthy y cols., 2009). Por lo tanto, la presencia de *McPIP2;1* en las células de la endodermis apoya la hipótesis de que ésta AQP podría estar participando en el flujo radial del agua a través de la vía célula-a-célula en las raíces de *M. crystallinum* para que ésta alcance el xilema y se distribuya en toda la planta. La exodermis es un tejido que se localiza inmediatamente después de la epidermis, desde un punto de vista radial, con bandas claramente suberizadas (Hose y cols., 2001), por lo tanto, se tendría que mostrar la deposición de suberina en las raíces de *M. crystallinum* para determinar si estos órganos desarrollan una exodermis. Por consiguiente, sería muy interesante detectar a las bandas de Caspari en las raíces de *M. crystallinum*, ya que esto proporcionaría información muy útil para tratar de definir la función fisiológica de *McPIP2;1* en dichos órganos bajo condiciones salinas.

En respuesta a estrés osmótico se localizó a *McPIP2;1* en células de la epidermis en los cortes transversales realizados en la región cercana (0.5 cm), intermedia (5.0 cm) y distal (10.0 cm) de la punta de la raíz de *M. crystallinum*. Aunado a lo anterior, en la región apical de la raíz también se encontró a *McPIP2;1* en células de la corteza y de la endodermis así como en vasos del xilema. Por consiguiente, al igual que bajo condiciones de salinidad, la localización de *McPIP2;1* en dichos tejidos sugiere que la absorción del agua por las raíces de *M. crystallinum* se podría llevar a cabo principalmente en la región apical, en la cual esta AQP podría estar participando en la toma y transporte radia del agua hasta los vasos del xilema por medio de la vía célula-a-célula cuando la planta ha respondido exitosamente contra el estrés osmótico impuesto y se tienen de nuevo las condiciones para que las raíces tomen agua nuevamente del ambiente. Como se menciona anteriormente, el estrés osmótico provoca el marchitamiento (pérdida de agua) de las hojas de *M. crystallinum* en las primeras horas después del estrés, sin embargo, aunque el contenido relativo de agua en estos órganos disminuyó un 20 % después del tratamiento, éste se mantuvo al mismo nivel a las 48 h, no disminuyó más con el tiempo (datos no mostrados), lo que indica que la planta está conteniendo de manera efectiva contra el estrés osmótico impuesto, lo cual estaría asociado con la producción y acumulación de prolina y pinitol que ocurre en las raíces bajo estrés osmótico (Adams y cols., 1998) ya que dichos osmolitos estarían participando en el proceso de ajuste osmótico de las raíces. Estos resultados indican que la expresión de *McPIP2;1* en la mayoría de las células cercanas

a la punta de la raíz podría ser parte de un mecanismo de preparación de la planta para que, una vez aliviado el estrés, ésta pueda absorber y distribuir el agua de manera rápida y eficiente hacia la parte aérea. El hecho de que no se haya encontrado a *McPIP2;1* en vasos del xilema en las regiones intermedia y distal de la raíz bajo estrés osmótico podría deberse a que en estas regiones la AQP podría estar involucrada principalmente en la regulación osmótica de las células de la epidermis, las cuales se encuentran en contacto directo con el estrés osmótico impuesto, aunque no se descarta la posibilidad de que en estas regiones otras AQPs pudieran estar mediando el transporte del agua hasta el xilema durante la etapa de recuperación de la planta.

Como se menciona en párrafos anteriores, el flujo radial del agua y de los solutos a través de la vía apoplástica está regulado por la diferenciación de bandas de Caspari, compuestas por lignina y suberina, tanto en la endodermis como en la exodermis de las raíces (Steudle y Peterson, 1998; Krishnamurthy y cols., 2009). Se ha reportado que el estrés hídrico (osmótico) induce la diferenciación de una exodermis en raíces de plántulas de maíz (Zimmermann y cols., 2000) así como la deposición de suberina en las paredes celulares de las células de la endodermis y de la exodermis en raíces de vid (*Vitis vinifera*; Vandeleur y cols., 2009). Además, en ambos reportes se encontró una correlación directa entre la deposición de suberina y la disminución de la permeabilidad apoplástica del agua a través de las raíces. Por lo tanto, la presencia de *McPIP2;1* en células de la endodermis en la región apical de la raíz apoya la hipótesis de que esta AQP podría estar participando en la toma y transporte radial del agua a través de las raíces de *M. crystallinum* durante la etapa de recuperación de la planta cuando se ha aliviado el estrés. Por consiguiente, la identificación de las bandas de Caspari y la determinación de la presencia o desarrollo de una exodermis en las raíces de *M. crystallinum* proporcionaría información relevante para la asignación de una función fisiológica para *McPIP2;1* cuando la planta se encuentra bajo estrés osmótico.

Además de su posible participación en la absorción del agua y carga de esta en el xilema de las raíces de *M. crystallinum* durante la etapa de recuperación de la planta después de un estrés salino y osmótico, la AQP *McPIP2;1* también podría estar participando en la elongación de las células cercanas a la punta de la raíz en las cuales se encuentra bajo dichas condiciones. Se ha reportado que bajo condiciones de estrés hídrico, con potenciales hídricos de -1.0 MPa y -0.5 MPa semejantes a los tratamientos salino y osmótico, respectivamente, que se utilizaron en este trabajo, se inhibe el crecimiento de la parte aérea de plántulas de maíz (Sharp y cols., 2004) y de soya (Yamaguchi y cols. 2010) pero no se inhibe el crecimiento de sus raíces, la raíz primaria de ambas plántulas continua creciendo aún bajo estrés hídrico. En estos reportes se mostró que el crecimiento de las raíces de ambas plántulas bajo estrés hídrico se debió al mantenimiento de la elongación de las células en la región apical, el cual se debe, en el caso de las raíces de plántulas de maíz, a un proceso de ajuste osmótico (toma de agua por las células) inducido por la acumulación de hexosas y de prolina en dicha región. La zona de elongación de las raíces de las plantas se encuentra en los primeros 10.0 mm a partir de la punta, por lo tanto, la identificación de *McPIP2;1* en células de la epidermis, de la corteza y de la endodermis en la región apical de la raíz sugiere que esta AQP puede tener una función en el mantenimiento del crecimiento de la raíz de *M. crystallinum* bajo condiciones salinas y de estrés osmótico mediante la regulación de la

toma de agua para la elongación de dichas células. Como se menciona anteriormente, uno de los mecanismos de tolerancia de *M. crystallinum* a la salinidad y al estrés osmótico es el ajuste osmótico mediante el cual la planta trata de disminuir su potencial hídrico para evitar la pérdida de agua hacia el suelo a través de las raíces y para favorecer la toma de ésta cuando se alivia el estrés. El ajuste osmótico en las raíces de *M. crystallinum* bajo estrés salino y osmótico está inducido por la acumulación de prolina y pinitol, por lo que es posible que estos osmolitos también participen en la elongación de las células apicales de la raíz bajo dichas condiciones. Para corroborar esto, se tendría que determinar si la acumulación de dichos osmolitos ocurre de manera homogénea en toda la raíz o solamente en algunas regiones específicas. El mantenimiento del crecimiento de las raíces bajo condiciones de estrés hídrico, p.e. durante sequía o salinidad de los suelos, representaría un beneficio muy grande para las plantas ya que las raíces cubrirían más espacio en el suelo, tanto a nivel superficial como de profundidad, para tratar de encontrar agua y mantener un suministro adecuado de ésta en las plantas.

## CONCLUSIONES

- *McPIP2;1* es un canal de agua funcional.
- *McPIP2;1* es selectivo para el transporte de agua.
- La actividad de *McPIP2;1* como canal de agua está regulada positivamente por fosforilación mediada por proteínas cinasas A y C.
- El residuo Ser<sup>282</sup> es necesario para la actividad de *McPIP2;1* como canal de agua mientras que el residuo Ser<sup>123</sup> es indispensable para dicha actividad.
- *McPIP2;1* se localiza subcelularmente en retículo endoplásmico/complejo de Golgi, tonoplasto y membrana plasmática, y bajo salinidad (200 mM NaCl por 7 días) se localiza en estas mismas membranas. En respuesta a las condiciones de salinidad y estrés osmótico (200 mM sorbitol/manitol por 48 h) usadas se incrementa la cantidad subcelular de *McPIP2;1*.
- *McPIP2;1* se fosforila en las membranas plasmáticas de las raíces de *M. crystallinum* y sus niveles de fosforilación se incrementan en respuesta a sal.
- *McPIP2;1* se localiza en células de la epidermis y de la endodermis y en los vasos del xilema en la región cercana a la punta de la raíz de *M. crystallinum*, mientras que en regiones alejadas de la punta se localiza principalmente en células de la epidermis.
- *McPIP2;1* se localiza en la mayoría de los tipos celulares (células de la epidermis, de la corteza, de la endodermis y vasos del xilema) cercanos a la punta de la raíz de *M. crystallinum* bajo condiciones salinas y de estrés osmótico. En regiones alejadas de la punta, *McPIP2;1* se localiza en células de la epidermis y en los vasos del xilema bajo condiciones salinas, y en células de la epidermis bajo estrés osmótico.

## PERSPECTIVAS

- Determinar la  $P_f$  (experimental y/o simulada) de *McPIP2;1* mutada en el residuo Glu<sup>32</sup> por un aminoácido sin carga (Ala) o cargado positivamente (Lys) para corroborar la hipótesis del taponamiento parcial del canal por el asa D.
- Determinar la  $P_f$  (experimental y/o simulada) de *McPIP2;1* mutada en los residuos Ser<sup>123</sup> y/o Ser<sup>282</sup> por un aminoácido cargado negativamente (Glu o Asp) para simular una condición de fosforilación permanente que mantendría activa, todo el tiempo, a la AQP *McPIP2;1*.
- Determinar si el residuo Ser<sup>286</sup> es necesario para la localización de *McPIP2;1* en la membrana plasmática (expresión de *McPIP2;1* mutada en dicho residuo por un aminoácido que no se fosforile (p.e. Ala) en ovocitos de *X. laevis*; expresión transitoria de la fusión GFP-*McPIP2;1* mutada en protoplastos de raíz).
- Determinar si *McPIP2;1* se glicosila en la membrana plasmática (glicosilación *in vitro*, proteómica) y establecer la posible función de dicha modificación post-traducciona en el tráfico vesicular y/o estabilización (protección contra proteasas) de la AQP.
- Analizar la expresión y fosforilación de *McPIP2;1* a tiempos cortos después de los tratamientos de salinidad y estrés osmótico para relacionarlas con la pérdida de turgor (marchitamiento) temporal que ocurre en las hojas.
- Determinar si *McPIP2;1* se fosforila por una CPDC (¿*McCPK1*?) en la membrana plasmática e identificarla (fosforilación *in vitro*, enzima purificada por cromatografía de afinidad).
- Determinar la participación de *McPIP2;1* en la permeabilidad al agua de protoplastos de la raíz (inhibición de la expresión de *McPIP2;1* mediante ARN antisentido o ARNi).
- Determinar si la permeabilidad al agua de protoplastos de la raíz está regulada por fosforilación (incubación de protoplastos con agonistas y antagonistas de la fosforilación antes de someterlos al choque hipo-osmótico) para establecer una relación y posible función *in planta* de la fosforilación de las AQPs (incluida *McPIP2;1*) de la raíz en la absorción del agua por dicho órgano.
- Determinar si *McPIP2;1* tiene residuos de Cys en la región del poro (análisis de estructuras 3D) y determinar si el HgCl (inhibidor de la actividad de las AQPs) inhibe el transporte de agua en ovocitos que expresen a dicha AQP, así como en protoplastos de raíz (ensayos de hinchamiento) y en la raíz completa (cámara de presión) para inferir la participación de *McPIP2;1* y otras AQPs en la toma de agua por las raíces.

- Analizar la acumulación del transcrito de *McPIP2;1* a lo largo de la raíz durante el crecimiento y desarrollo de la planta y bajo condiciones de salinidad y estrés osmótico para determinar posibles procesos de regulación transcripcional.
- Determinar la presencia de bandas de Caspari mediante la identificación de suberina (tinciones con hemisulfato de berberina) a lo largo de la raíz bajo condiciones normales de crecimiento y desarrollo y en respuesta a estrés salino y osmótico, así como determinar cuantitativamente (mediante HPLC) los posibles cambios observados para inferir la participación de las AQPs de la raíz en la toma de agua por las raíces a través de la vía simplástica.
- Determinar el transporte de agua tanto en células (sonda de presión celular) como en raíz completa (cámara de presión) bajo condiciones de salinidad y estrés osmótico para determinar alteraciones (¿aumentos?) en la permeabilidad de la raíz al agua durante la recuperación del turgor de las hojas bajo las condiciones mencionadas.
- Determinar el contenido relativo de agua en las hojas y en las raíces bajo condiciones normales de crecimiento y desarrollo, en respuesta a estrés salino y osmótico, así como en respuesta a HgCl para relacionar la demanda de agua por las hojas con la absorción del agua por las raíces mediada por las AQPs.
- Determinar la acumulación de NaCl en las raíces y hojas con el tiempo después de tratar a las plantas, así como la osmolaridad de las raíces y hojas para determinar cambios en el potencial osmótico (acumulación de solutos) que favorezcan la toma de agua por las raíces durante la recuperación de la planta.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Adams, P., Nelson, D.E., Yamada, S., Chmara, W., Jensen, R.G., Bohnert, H.J. & Griffiths, H.** (1998) Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol* 138: 171-190.
2. **Agre, P.** (2006) The Aquaporin Water Channels. *Proc Am Thorac Soc* 3: 5-13.
3. **Aharon, R., Shahak, Y., Wininger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y. & Galii, G.** (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15: 439-447.
4. **Amezcuca-Romero, J.C., Pantoja, O. & Vera-Estrella, R.** (2010) Ser<sup>123</sup> is essential for the water channel activity of McPIP2;1 from *Mesembryanthemum crystallinum*. *J Biol Chem* 285: 16739-16747.
5. **Andrews, S., Reichow, S.L. & Gonen, T.** (2008) Electron Crystallography of Aquaporins. *IUBMB Life* 60: 430-436.
6. **Aroca, R., Amodeo, G., Fernández-Illescas, S., Herman, E.M., Chaumont, F. & Chrispeels, M.J.** (2005) The Role of Aquaporins and Membrane Damage in Chilling and Hydrogen Peroxide Induced Changes in the Hydraulic Conductance of Maize Roots. *Plant Physiol* 137: 341-353.
7. **Askerlund, P., Larsson, C., Widell, S. & Moller, I.M.** (1987) NADP(H) oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. *Physiol Plantarum* 71: 9-19.
8. **Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Pantoja, O., Kirch, H.H. & Bohnert, H.J.** (1999) Aquaporin localization – how valid are the TIP and PIP labels? *Trends Plant Sci* 4: 86-88.
9. **Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Maldonado-Gama, M. & Pantoja, O.** (1999b) Abscisic acid induction of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is developmentally regulated. *Plant Physiol* 120: 811-819.
10. **Bartels, D. & Sunkar, R.** (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24: 23-58.
11. **Beitz, E., Wu, B., Holm, L.M., Schultz, J.E., & Zeuthen, T.** (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia and protons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 269-274.
12. **Bhandal, I.S. & Malik, C.P.** (1988) Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *International Review of Cytology*. 110: 205-254.
13. **Biela, A., Grote, K., Otto, B., Hoth, S., Hedrich, R. & Kaldenhoff, R.** (1999) The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J* 18: 565-570.
14. **Blaha, G., Stelzl, U., Spahn, C.M.T., Agrawal, R.K., Frank, J. & Nierhaus, K.H.** (2000) Preparation of functional ribosomal complexes and effects of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Method Enzymol.* 317: 292-309.
15. **Blumwald, E., Aharon, G.S. & Apse, M.P.** (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1465: 140-151.

16. **Bohnert, H.J., Ostrem, J.A., Cushman, J.C., Michalowski, C.B., Rickers, J., Meyer, G., deRocher, E.J., Vernon, D.M., Krueger, M., Vazquez-Moreno, L., Velten, J., Hoefner, R. & Schmitt, J.M.** (1988) *Mesembryanthemum crystallinum*, a higher plant model for the study of environmentally induced changes in gene expresión. *Plant Mol Biol Rep* 6: 10-28.
17. **Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D-T., Sorieul, M., van den Dries, N. & Maurel, C.** (2005) Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* 139: 790-805.
18. **Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
19. **Bramley, H., Turner, N.C., Turner, D.W. & Tyerman, S.D.** (2009) Roles of morphology, anatomy, and aquaporins in determining contrasting hydraulic behavior of roots. *Plant Physiol* 150: 348-364.
20. **Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** (2000) Responses to abiotic stresses. En: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA, pp. 1158-1175.
21. **Brown, D., Katsura, T. & Gustafson, C.E.** (1998) Cellular mechanisms of aquaporin trafficking. *Am J Physiol* 275 (*Renal Physiol* 44): F328-F331.
22. **Calamita, G., Bishai, W.R., Preston, G.M., Guggino, W.B. & Agre, P.** (1995) Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from Escherichia coli. *J Biol Chem* 270: 29063-29066.
23. **Canut, H., Bauer, J. & Weber, G.** (1999) Separation of plant membranes by electromigration techniques. *J Chromat B* 722: 121-139.
24. **Chatterjee, S.K., Kim, U. & Bielat, K.** (1976) Plasma membrane associated enzymes of mammary tumors as the biochemical indicators of metastasizing capacity. Analyses of enriched plasma membrane preparations. *Br J Cancer* 33: 15-26.
25. **Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R. & Chrispeels, M.J.** (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol* 122: 1025-1034.
26. **Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M.J. & Jung, R.** (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant physiol* 125: 1206-1215.
27. **Chaumont, F., Moshelion, M. & Daniels, M.J.** (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* 97: 749-764.
28. **Chehab, E.W., Patharkar, O.R., Hegeman, A.D., Taybi, T. & Cushman, J.C.** (2004) Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. *Plant Physiol* 135: 1430-1446.
29. **Daniels, M.J., Mirkov, T.E. & Chrispeels, M.J.** (1994) The plasma membrane of Arabidopsis thaliana contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol* 106: 1325-1333.
30. **Daniels, M.J., Chrispeels, M.J. & Yeager, M.** (1999) Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by elecetron cryo-crystallography. *J Mol Biol* 294: 1337-1349.



31. **Danielson, J.A. & Johanson, U.** (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 8: 45-60.
32. **Dean, R.M., Rivers, R.L., Zeidel, M.L. & Roberts, D.M.** (1999) Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry* 38: 347-353.
33. **Eichholtz, T., de Bont, D.B., de Widt, J., Liskamp, R.M. & Ploegh, H.L.** (1993) A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J Biol Chem* 268: 1982-1986.
34. **Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J-E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P.M. & Sánchez, F.** (2006) *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1385-1393.
35. **Faso, C., Boulaflous, A. & Brandizzi, F.** (2009) The plant Golgi apparatus: last 10 years of answered and open questions. *FEBS Letters* 583: 3752-3757.
36. **Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M. & Chaumont, F.** (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* 16: 215-228.
37. **Flowers, T.J. & Colmer, T.D.** (2008) Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol* 179: 945-963.
38. **Fotiadis, D., Jenó, P., Mini, T., Wirtz, S., Mulle, S.A., Frayse, L., Kjellbom, P. & Engel, A.** (2001) Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *J Biol Chem* 276: 1707-1714.
39. **Foyer, C.H. & Noctor, G.** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. En: *Antioxidants & Redox Signaling*. Ed. Buchanan, B., Dietz, K.J. y Pfannschmidt, T. 11: 862-905.
40. **Franke, R. & Schreiber, L.** (2007) Suberin – a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr Opin Plant Biol* 10: 252-259.
41. **Frensch, J., Hsiao, T.C. & Steudle, E.** (1996) Water and solute transport along developing maize roots. *Planta* 198: 348-355.
42. **Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J. & Stroud, R.M.** (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 290: 481-486.
43. **Fuji, K., Miwa, K. & Fujiwara, T.** (2009) The intracellular transport of transporters: membrane trafficking of mineral transporters. *Curr Opin Plant Biol* 12: 699-704.
44. **Fujiyoshi, Y., Mitsuoka, K., de Groot, B.L., Philippsen, A., Grubmüller, H., Agre, P. & Engel, A.** (2002) Structure and function of water channels. *Curr Opin Struc Biol* 12: 509-515.
45. **Fushimi, K., Sasaki, S. & Marumo, F.** (1997) Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem* 272: 14800-14804.
46. **Gehring, C.** (2010) Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling – past and present. *Cell Commun Signal* 8: 15.
47. **Gerbeau, P., Güclü, J., Ripoche, P. & Maurel, C.** (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J* 18: 577-587.

48. **Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P. & Maurel, C.** (2002) The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J* 30: 71-81.
49. **Glenn, E.P., Brown, J.J. & Blumwald, E.** (1999) Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Review in Plant Sciences*. 18: 227-255.
50. **Gonen, T. & Walz, T.** (2006) The structure of aquaporins. *Quart Rev Biophys* 39: 361-396.
51. **Greenway, H. & Munns, R.** (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann Rev Plant Physiol* 31: 149-190.
52. **Greenway, H. & Osmond, C.B.** (1972) Salt Responses of Enzymes from Species differing in Salt Tolerance. *Plant Physiol* 49: 256-259.
53. **Guenther, J.F., Chanmanivone, N., Galetovic, M.P., Wallace, I.S., Cobb, J.A. & Roberts, D.M.** (2003) Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine-262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell* 15: 981:991.
54. **Guex, N. & Peitsch, M.C.** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
55. **Gustavsson, S., Lebrun, A.S., Nordén, K., Chaumont, F. & Johanson, U.** (2005) A novel plant major intrinsic protein in *Physcomitrella patens* most similar to bacterial glycerol channels. *Plant Physiol* 139: 287-295.
56. **Hachez, C., Zelazny, E. & Chaumont, F.** (2006) Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? *Biochim Biophys Acta* 1758: 1142-1156.
57. **Hanba, Y.T., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I. & Katsuhara, M.** (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO<sub>2</sub> conductance and CO<sub>2</sub> assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* 45: 521-529.
58. **Harris, T.E., Persaud, S.J. & Jones, P.M.** (1997) Pseudosubstrate inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase in intact pancreatic islets: effects on cyclic AMP-dependent and glucose-dependent insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 648-651.
59. **Harvengt, P., Vlerick, A., Fuks, B., Wattiez, R., Ruyschaert, J.M. & Homble, F.** (2000) Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-regulated kinase. *Biochem J* 352: 183-190.
60. **Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. & Bohnert, H.J.** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 463-499.
61. **Hedfalk, K., Törnroth-Horsefield, S., Nyblom, M., Johanson, U., Kjellbom, P. & Neutze, R.** (2006) Aquaporin gating. *Curr Opin Struct Biol* 16: 447-456.
62. **Hendriks, G., Koudijs, M., van Balkom, B.W., Oorschot, V., Klumperman, J., Deen, P.M. & van der Sluijs, P.** (2004) Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 2975-2983.
63. **Hill, A.E., Shachar-Hill, B. & Shachar-Hill, Y.** (2004) What are aquaporins for? *J Membrane Biol.* 197: 1-32.
64. **Hill, W.G., Southern, N.M., MacIver, B., Potter, E., Apodaca, G., Smith, C.P. & Zeidel, M.L.** (2005) Isolation and characterization of the *Xenopus* oocyte plasma

- membrane: a new method for studying activity of water and solute transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F217-F224.
65. **Hoagland, D.R. & Arnon, D.I.** (1938) The water culture method for growing plants without soil. *Calif Exp Stn Circ* 347: 1-39.
  66. **Hopkins, W.G.** (1995a) Plant cells and water. En: Introduction to plant physiology. John Wiley & Sons, Canada, pp. 23-40.
  67. **Hopkins, W.G.** (1995b) The physiology of plants under stress. En: Introduction to plant physiology. John Wiley & Sons, Canada, pp. 423-431.
  68. **Horsefield, R., Nordén, K., Fellert, M., Backmark, A., Törnroth-Horsefield, S., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Kvassman, J., Kjellbom, P., Johanson, U. & Neutze, R.** (2008) High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13327-13332.
  69. **Hose, E., Clarkson, D.T., Steudle, E., Schreiber, L. & Hartung, W.** (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *J Exp Bot* 52: 2245-2264.
  70. **Ingram, J. & Bartels, D.** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377-403.
  71. **Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M.H. & Maeshima, M.** (2005) Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 579: 5814-5820.
  72. **Ishitani, M., Majumder, A.L., Bornhouser, A., Michalowski, C.B., Jensen, R.G. & Bohnert, H.J.** (1996) Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J* 9: 537-548.
  73. **Jaspers, P. & Kangasjärvi, J.** (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plantarum* 138: 405-413.
  74. **Javot, H. & Maurel, C.** (2002) The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Botany* 90: 301-313.
  75. **Johansson, I., Larsson, C., Ek, B. & Kjellbom, P.** (1996) The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca<sup>2+</sup> and apoplastic water potential. *Plant Cell* 8: 1181-1191.
  76. **Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V.K., Chrispeels, M.J., Larsson, C. & Kjellbom, P.** (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10: 451-459.
  77. **Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. & Kjellbom, P.** (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta* 1465: 324-342.
  78. **Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysse, L., Weig, A.R. & Kjellbom, P.** (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* 126: 1358-1369.
  79. **Johnson, K.D. & Chrispeels, M.J.** (1992) Tonoplast-bound protein-kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant Physiol* 100: 1787-1795.
  80. **Kaldenhoff, R., Grote, K., Zhu, J.J. & Zimmermann, U.** (1998) Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14: 121-128.

81. **Kamsteeg, E.J., Heijnen, I., van Os, C.H. & Deen, P.M.T.** (2000) The subcellular localization of an Aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers. *J Cell Biol* 151: 919-929.
82. **Kamsteeg, E.J. & Deen, P.M.** (2001) Detection of aquaporin-2 in the plasma membranes of oocytes: a novel isolation method with improved yield and purity. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 683-690.
83. **Karahara, I., Ikeda, A., Kondo, T. & Uetake, Y.** (2004) Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta* 219: 41-47
84. **King, L.S., Kozono, D. & Agre, P.** (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 687-698.
85. **Kirch, H.H., Vera-Estrella, R., Gollmack, D., Quigley, F., Michalowski, C.B., Barkla, B.J. & Bohnert, H.J.** (2000) Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* 123: 111-124.
86. **Klimecka, M. & Muszynska, G.** (2007) Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol* 54: 219-233.
87. **Kosugi-Tanaka, C., Li, X., Yao, C., Akamatsu, T., Kanamori, N. & Hosoi, K.** (2006) Protein kinase A-regulated membrane trafficking of a green fluorescent protein-aquaporin 5 chimera in MDCK cells. *Biochim Biophys Acta* 1763: 337-344.
88. **Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Franke, R., Prakash, H. S., Schreiber, L. & Mathew, M. K.** (2009) Effects of NO<sub>3</sub> deficiency and NaCl stress on suberin deposition in rhizoand hypodermal (RHCW) and endodermal cell walls (ECW) of castor bean (*Ricinus communis* L.) roots. *Plant Soil* 269: 333-339
89. **Lin, W., Peng, Y., Li, G., Arora, R., Tang, Z., Su, W. & Cai, W.** (2007) Isolation and functional characterization of PgTIP1, a hormone-autotrophic cells-specific tonoplast aquaporin in ginseng. *J Exp Bot* 58: 947-956.
90. **Mahajan, S. & Tuteja, N.** (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys* 444: 139-158.
91. **Marinelli, R.A., Pham, L., Agre, P. & LaRusso, N.F.** (1997) Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane. *J Biol Chem* 272: 12984-12988.
92. **Marschner, H.** (1995) Potassium. En: Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic press limited, London, 299-312.
93. **Martre, P., Cochard, H. & Durand, J-L.** (2001) Hydraulic architecture and water flow in growing grass tillers (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Cell Environ* 24: 65-76.
94. **Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G.B., Nobel, P.S. & Chrispeels, M.J.** (2002) Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.* 130: 2101-2110.
95. **Maurel, C., Kado, R.T., Guern, J. & Chrispeels, M.J.** (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP. *EMBO J* 14: 3028-3035.
96. **Maurel, C.** (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 399-429.
97. **Maurel, C., Tacnet, F., Güclü, J., Guern, J. & Ripoche, P.** (1997) Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically

- different water permeability and water channel activity. *PNAS USA* 94: 7103-7108.
98. **Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P. Tournaire, C. Santoni, V & Heyes, J.** (2002) Molecular physiology of aquaporins in plants. *Int Rev Cytol* 215: 105-148.
  99. **Maurel, C.** (2007) Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters* 581: 2227-2236.
  100. **Maurel, C., Verduocq, L., Luu, D.T. & Santoni, V.** (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59: 595-624.
  101. **Maurel, C., Santoni, V., Luu, D-T., Wudick, M.M. & Verduocq, L.** (2009) The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Curr Opin Plant Biol* 12: 690-698.
  102. **Melo, F., Sánchez, R. & Sali, A.** (2002) Statistical potentials for fold assessment. *Protein Sci* 11: 430-448.
  103. **Mellor, H. & Parker, P.J.** (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332: 281-292.
  104. **Miao, G.H., Hong, Z. & Verma, D.P.S.** (1992) Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane. *J Cell Biol* 118: 481-490.
  105. **Mikosch, M. & Homann, U.** (2009) How do ER export motifs work on ion channel trafficking? *Curr Opin Plant Biol* 12: 685-689.
  106. **Mishra, S.K., Garg, N.K. & Kidwai, A.M.** (1985) Isolation and characterization of plasma membrane from *Acanthamoeba culbertsoni*. *J Biosci* 3-4: 365-373.
  107. **Mizutani, M., Watanabe, S., Nakagawa, T. & Maeshima, M.** (2006) Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47: 1420-1426.
  108. **Morré, D.J., Lawrence, J., Safranski, K., Hammond, T. & Morré, D.M.** (1994) Experimental basis for separation of membrane vesicles by preparative free-flow electrophoresis. *J Chromat A* 668:201-213.
  109. **Munns, R.** (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypothesis. *Plant Cell Environ* 16: 15-24.
  110. **Munns, R.** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environ* 25: 239-250.
  111. **Munns, R., & Tester, M.** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651-658.
  112. **Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A. & Fujiyoshi, Y.** (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* (London) 407: 599-605.
  113. **Nemeth-Cahalan, K.L. & Hall, J.E.** (2000) pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0. *J Biol Chem* 275: 6777-6782.
  114. **Newton, R.P. & Smith, C.J.** (2004) Cyclic nucleotides. *Phytochemistry* 65: 2423-2437.
  115. **Nielsen, S., Chou, C.L., Marples, D., Christensen, E.I., Kishore, B.K. & Knepper, M.A.** (1995) Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci, USA* 92: 1013-1017.

116. **Okubo-kurihara, E., Sano, T., Higaki, T., Kutsuna, N. & Hasezawa, S.** (2009) Acceleration of vacuolar regeneration and cell growth by overexpression of an aquaporin NtTIP1;1 in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 50: 151-160.
117. **Orcutt, D.M. & Nilsen, E.T.** (2000) Salinity Stress. En: *Physiology of Plants under Stress. Soil and Biotic Factors*. John Wiley & Sons, Inc., Canadá, 177-235.
118. **Pantoja, O., Barkla, B.J. & Vera-Estrella, R.** (2000) Ion channels and ion co-transporters in the tonoplast. In *Vacuolar Compartments*. Robinson, D.G. y Rogers, J.C. (eds). Sheffield Academic Press England. *Annu Plant Rev* 5: 199-220.
119. **Parida, A.K. & Das, A.B.** (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox Environ Safety* 60: 324-349.
120. **Pieper, U., Webb, B.M., Barkan, D.T., Schneidman-Duhovny, D., Schlessinger, A., Braberg, H., Yang, Z., Meng, E.C., Pettersen, E.F., Huang, C.C., Datta, R.S., Sampathkumar, P., Madhusudhan, M.S., Sjölander, K., Ferrin, T.E. Burley, S.K. & Sali, A.** (2011) ModBase, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Res* 39: D465-D474.
121. **Prak, S., Hem,m S., Boudet, J., Viennois, G., Sommerer, N., Rossignol, M., Maurel, C. & Santoni, V.** (2008) Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Mol Cell Proteomics* 7: 1019-1030.
122. **Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y. & Bohnert, H.J.** (2001) From genome to function: the Arabidopsis aquaporins. *Gen Biol* 3:1-17.
123. **Reinhardt, D.H. & Rost, T.L.** (1995) Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environ Exp Bot* 35: 563 574.
124. **Reisen, D., Loborgne-Caste,l N., Ozalp, C., Chaumont, F. & Marty, F.** (2003) Expression of a cauliflower tonoplast aquaporin tagged with GFP in tobacco suspension cells correlates with an increase in cell size. *Plant Mol Biol* 52: 387-400.
125. **Robinson, D.G., Sieber, H., Kammerloher, W. & Schaffner, A.R.** (1996) PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *Plant Physiol* 111: 645-649.
126. **Rodríguez-Rosales, M.P., Gálvez, F.J., Huertas, R., Aranda, M.N., Baghour, M., Cagnac, O. & Venema, K.** (2009) Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal Behavior* 4: 265-276.
127. **Sakurai, J., Ishikawa, F., Yamaguchi, T., Uemura, M. & Maeshima, M.** (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol* 46: 1568-1577.
128. **Salisbury, F.B. & Ross, C.W.** (1992a) Diffusion, Thermodynamics, and Water Potential. En: *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, pp. 27-43.
129. **Salisbury, F.B. & Ross, C.W.** (1992b) Osmosis. En: *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, pp. 44-65.
130. **Salisbury, F.B. & Ross, C.W.** (1992c) Growth and Development. En: *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, pp. 337-340.

131. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
132. **Schreiber, L., Franke, R. & Hartmann, K.** (2005) Effects of NO<sub>3</sub> deficiency and NaCl stress on suberin deposition in rhizo and hypodermal (RHCW) and endodermal cell walls (ECW) of castor bean (*Ricinus communis* L.) roots. *Plant Soil* 269: 333–339
133. **SEMARNAT** (2008) Informe de la situación del medio ambiente en México. Gobierno federal. México. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. <http://www.semarnat.gob.mx>.
134. **Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, L.G., Spollen, W.G., Springer, G.K., Bohnert, H.J. & Nguyen, H.T.** (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J Exp Bot* 55: 2343-2351.
135. **Siefritz, F., Tyree, M.T., Lovisolo, C., Schubert, A. & Kaldenhoff, R.** (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14: 869-876.
136. **Sjövall-Larsen, S., Alexandersson, E., Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U. & Kjellbom, P.** (2006) Purification and characterization of two protein kinases acting on the aquaporin SoPIP2;1. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1157-1164.
137. **Sorieul, M., Santoni, V., Maurel, C. & Luu, D-T.** (2011) Mechanisms and effects of retention of over-expressed aquaporin AtPIP2;1 in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 12: 473-482.
138. **Steudle, E.** (2000) Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant Soil* 226: 45-56.
139. **Steudle, E.** (2001) The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 847-875.
140. **Steudle, E. & Peterson, C.A.** (1998) How does water get through roots? *J Exp Bot* 49: 775-788.
141. **Sui, H., Han, B.G., Lee, J.K., Walian, P. & Jap, B.K.** (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414: 872-878.
142. **Tester, M. & Davenport, R.** (2003) Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann Botany* 91: 503-527.
143. **Thomas, J. C. & Bohnert, H.J.** (1993) Salt stress perception and plant growth regulators in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* 103: 1299-1304.
144. **Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R. & Kjellbom, P.** (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688-694.
145. **Törnroth-Horsefield, S., Hedfalk, K., Fischer, G., Lindkvist-Petersson, K. & Neutze, R.** (2010) Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *FEBS Letters* 584: 2580-2588.
146. **Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D.T., Blligny, R. & Maurel, C.** (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425: 393-397.
147. **Tyerman, S.D., Bohnert, H.J., Maurel, C., Steudle, E. & Smith, J.A.C.** (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J Exp Bot* 50: 1055-1071.

148. **Tyerman, S.D., Niemietz, C.M. & Bramley, H.** (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* 25: 173-194.
149. **Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F. & Kaldenhoff, R.** (2003) The tobacco aquaporin *NtAQP1* is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature* 425: 734-737.
150. **Uehlein, N., Otto, B., Hanson, D.T., Fischer, M., McDowell, N. & Kaldenhoff, R.** (2008) Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO<sub>2</sub> permeability. *Plant Cell* 20: 648-657.
151. **Vandeleur, R.K., Mayo, G., Suelden, M.C., Gilliam, M., Kaiser, B.N. & Tyerman, S.D.** (2009) The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiol* 149: 445-460.
152. **Van Wilder, V., Miecielica, U., Degand, H., Derua, R., Waelkens, E. & Chaumont, F.** (2008) Maize plasma membrane aquaporins belonging to the PIP1 and PIP2 subgroups are in vivo phosphorylated. *Plant Cell Physiol* 49: 1364-1377.
153. **Vasconsuelo, A. & Boland, R.** (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci* 172: 861-875.
154. **Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J. & Pantoja, O.** (1999) Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant. *Planta* 207: 426-435.
155. **Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Gallardo-Amarillas, C., Bohnert, H.J. & Pantoja, O.** (2000) Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport, pp. 339-346, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
156. **Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J., & Pantoja, O.** (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol* 135: 2318-2329.
157. **Verdoucq, L., Grondin, A. & Maurel, C.** (2008) Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochem J* 415: 409-416.
158. **Wall, D.A. & Patel, S.** (1989) Isolation of Plasma Membrane Complexes from *Xenopus* Oocytes. *J Membrane Biol* 107: 189-201.
159. **Wallace, I.S. & Roberts, D.M.** (2005) Distinct transport selectivity of two structural subclasses of the nodulin-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels. *Biochemistry* 44: 16826-16834.
160. **Weaver, C.D. & Roberts, D.M.** (1992) Determination of the site of phosphorylation of nodulin-26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. *Biochemistry* 31: 8954-8959.
161. **Wisniewski, K. & Zagdanska, B.** (2001) Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J Exp Bot* 52: 1455-1463.
162. **Wudick, M.M., Luu, D-T. & Maurel, C.** (2009) A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytol* 184: 289-302.
163. **Xiong, L. & Zhu, J.K.** (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell Environ* 25: 131-139.



164. **Yamada, S., Katsuhara, M., Nelly, W.B., Michalowski, C.B. & Bohnert, H.J.** (1995) A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7: 1129-1142.
165. **Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T.H., Nielsen, S., Guggino, W.B. & Agre, P.** (1999) Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402: 184-187.
166. **Yamaguchi, M., Valliyodan, B., Zhang, J., LeNoble, M.E., Yu, Q., Rogers, E.E., Nguyen, H.T. & Sharp, R.E.** (2010) Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant Cell Environ* 33: 223–243.
167. **Yeo, A.** (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J Exp Bot* 49: 915-929.
168. **Zelazny, E., Borst, J.W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M.A. & Chaumont, F.** (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12359-12364.
169. **Zelazny, E., Miecielica, U., Borst, J.W., Hemminga, M.A. & Chaumont, F.** (2009) An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins *ZmPIP2;4* and *ZmPIP2;5* to the plasma membrana. *Plant J* 57: 346-355.
170. **Zeuthen, T. & Klaerke, D.A.** (1999) Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H<sup>+</sup>. *J Biol Chem* 274: 21631-21636.
171. **Zhang, W.H. & Tyerman, S.D.** (1991) Effect of low O<sub>2</sub> concentration and azide on hydraulic conductivity and osmotic volume of the cortical-cells of wheat roots. *Aust J Plant Physiol* 18: 603-613.
172. **Zhu, J.K.** (2001a) Plant salt stress. En: encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Ltd. Pag. 1-3.
173. **Zhu, J.K.** (2001b) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 66-71.
174. **Zimmermann, H.M., Hartmann, K., Schreiber, L. & Steudle, E.** (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210: 302-311.
175. **Zimmermann, H.M. & Steudle, E.** (1998) Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* 206: 7-19.