



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS (BIOQUÍMICA)

ACTIVIDAD DE GLUTAMINO SINTETASA
EN PLÁNTULAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)
SOMETIDAS A ESTRÉS POR SAL (NaCl)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS
(B I O Q U Í M I C A)**

P R E S E N T A

JOSÉ LUIS BUSTO SÁNCHEZ



MÉXICO, D. F.

2007



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre. Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A NADIA

A : JOSÉ LUIS, GLORIA, JULIETA, EDITH, VICTOR HUGO, MARIANA
Y TODOS LOS QUE ME HAN APOYADO.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Fernando Montiel, por permitirme la realización del presente trabajo bajo su dirección.

Agradezco a la M. en C. Raquel Ortega por su entusiasta colaboración durante la elaboración del presente trabajo.

Contenido

I.	Antecedentes	1
1	El problema de la salinidad en la agricultura.	1
2	Respuesta de los vegetales ante el estrés salino.	9
3	Biosíntesis de osmolitos y osmoregulación	14
4	Asimilación de amonio y ciclo GS/GOGAT	16
	i. Glutamino sintetasa (E.C. 6.3.1.2.)	19
	ii. Glutamino sintetasa de maíz (<i>Zea mays</i> L.)	34
II.	Hipótesis	46
III.	Objetivo general	47
IV.	Objetivos particulares	48
V.	Material y métodos	49
VI.	Resultados	59
VII.	Discusión	74
VIII.	Conclusión	80
IX.	Anexos	81
	i. Valores aparentes de K_M de glutamino sintetasa	81
	ii. Evaluación inicial de la expresión del gen de glutamino sintetasa	82
X.	Referencias	83

I Antecedentes

1.- El problema de la salinidad en la agricultura.

La salinidad es el principal factor que reduce el crecimiento vegetal y la productividad agrícola en el mundo. Históricamente, la salinidad del suelo ha contribuido al declive de muchas civilizaciones antiguas como la de los sumerios en Mesopotamia y las que se ubicaron en regiones de China y la América pre Colombina debido a un mal manejo de sus cultivos (Serrano, 1996). A pesar del avance tecnológico disponible actualmente, la salinización de millones de hectáreas de tierra continúa reduciendo de manera drástica la producción de granos en el mundo entero. La solución al problema es de una abrumadora urgencia (Francois y Mass, 1994; FAO, 2005).

La Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de Norteamérica ha incluido a la salinización de los suelos y del agua como uno de los procesos principales que pueden contribuir hacia una catástrofe biológica de nivel mundial (Francois y Mass, 1994). Buringh (1978) estimó a partir de varios datos disponibles, que en el mundo entero se pierden al menos 10 hectáreas de tierra cultivable cada minuto, 5 debidas a la erosión de los suelos, 3 debidas a la salinización, 1 debida a los procesos de degradación del suelo, y una por usos de tipo no- agrícolas (Abrol *et al.*, 1988; Zhu *et al.*, 2005). Más recientemente, para el caso de Mexico, se ha calculado que la pérdida de suelo presenta una tasa de velocidad promedio de aproximadamente 2.8 ton/ha/año lo que equivale a perder 536 millones de toneladas de material de suelo cada año (FAO, 2005).

El problema de la degradación del suelo es una seria amenaza para el bienestar de la humanidad. El suelo es uno de los recursos naturales más preciosos cuando es manejado de manera adecuada. Sin embargo, la degradación de la tierra siempre se ha relacionado con el uso que le da la humanidad. Este proceso se ha acelerado debido al incremento de la población en los últimos años y a una demanda cada vez más creciente en la producción de alimentos (Abrol *et al.*, 1988). Cerca del 50 % de la tierra irrigada en las zonas áridas y semi áridas presenta algún grado de salinización. Con el dato anterior se puede tener idea de la magnitud del problema, el cual debe ser enfrentado para cubrir las necesidades alimentarias mundiales (Abrol *et al.*, 1988). En todo el mundo, existen millones de hectáreas de tierra con demasiada sal para sostener la producción de cultivos con importancia alimenticia, además de que cada año una cantidad cada vez más creciente de tierras se hace no productiva debido a la acumulación de sal. Los problemas de salinidad en la agricultura son confinados comúnmente solo a las regiones áridas y semiáridas, en donde la cantidad de lluvia no alcanza a transportar las sales de las zonas en las que se localizan las raíces de las plantas. Estas áreas comprenden alrededor del 25 % de la superficie de la tierra (Carter, 1975). También, y frecuentemente, se pueden presentar problemas de salinidad en planicies aluviales fértiles, valles y áreas costeras, cercanas a áreas densamente pobladas y a sistemas de irrigación. Debido a lo anterior, los agricultores podrían estar utilizando solamente el 75% del área en la que crecen los cultivos (Szabolcs, 1994; FAO, 2005).

Los problemas de salinidad de importancia económica pueden surgir cuando suelos previamente no-salinos se convierten en salinos como resultado de las prácticas de irrigación. El agua usada para irrigar puede contener de 100 a 1000 g de sal por metro cúbico de agua. Debido a que la aplicación anual de agua puede llegar a valores de 10,000 m³/ha la adición anual de sal al suelo puede tener valores de 1 a 10 ton/ha (Shainberg, 1975). En Israel por ejemplo, en ciertas áreas, el contenido de sal en el agua tiene valores de 700 p.p.m. o 700 g/m³ por lo que la adición anual de sal puede llegar a ser de hasta 7 ton/ha. De esta manera cantidades considerables de sales solubles pueden ser agregadas a los suelos irrigados en periodos relativamente cortos de tiempo (Shainberg, 1975). El manejo adecuado de los suelos salinos implica esfuerzos para poder mantener una producción sustentable tanto de alimentos como de fibra (Carter, 1975 y Dudley, 1994).

De continuar la tasa actual de crecimiento poblacional (FAO, 2005), el futuro alimentario necesita:

- a) Mejorar el nivel de manejo de los suelos con uso agrícola.
- b) Incorporar tierras potencialmente arables y que actualmente no están cultivadas

En la conferencia sobre desertificación realizada por la Organización de las Naciones Unidas en 1977 en Nairobi se recomendaba que se implementaran medidas urgentes para combatir la desertificación de las tierras irrigadas previniendo y controlando el anegamiento, salinización y sodicación; modificando las técnicas agrícolas que pudieran incrementar la productividad de forma regular y sostenible; desarrollando nuevas formas de irrigación y drenaje apropiados utilizando un esquema integrado y a través del mejoramiento de las condiciones económicas y sociales de la gente que depende de la agricultura por irrigación (Organización de las Naciones Unidas, 1977). A partir de esta conferencia, se estableció una Convención de las Naciones Unidas de Lucha Contra la Desertificación (UNCCD por sus siglas en inglés) que desde entonces mantiene programas y reuniones así como reportes de los países que se encuentran afectados por la desertificación (UNCCD, 2007).

Los problemas de salinidad en los suelos son antiguos pero su magnitud e intensidad se ha incrementado rápidamente debido a los esfuerzos a gran escala para incorporar áreas adicionales al esquema de irrigación. El problema ha empeorado por el desarrollo de sistemas de irrigación sin un adecuado suministro de drenaje y se agrava aún más debido a un mal manejo del agua y procesos deficientes de reclamación de los mismos (Abrol *et al.*, 1988).

Una producción de grano sostenible y rentable en suelos afectados por sal es posible si se toman las decisiones adecuadas para su manejo. Para tener éxito, los agricultores requieren de un entendimiento de cómo es que las plantas responden a la salinidad, la tolerancia relativa de diferentes especies y la sensibilidad en los diferentes estadios de crecimiento, además de saber cómo es que los diferentes tipos de suelo y condiciones ambientales afectan a las plantas estresadas por sal (Francois y Mass, 1994).

Extensión y causas de los suelos afectados por sal.

Basados en el mapa de suelos de la FAO/Unesco, se tiene que el área total de suelos salinos es de 397 millones de hectáreas y el área de suelos sódicos cubre una superficie de 434 millones de hectáreas a nivel mundial. De los 230 millones de hectáreas actuales de tierra irrigada, 45 millones son suelos afectados por sal (19.5 %) y de los casi 1,500 millones de hectáreas de agricultura en tierra firme, 32 millones corresponden a suelos afectados por sal. otros autores estiman que la cantidad puede llegar a ser de hasta 43 millones de hectáreas de tierra irrigada (FAO, 2005).

Se calcula también que la actividad humana ha formado alrededor de 77 millones de hectáreas de tierra salinizada. En las zonas semiáridas y áridas del mundo, la escasez de lluvias así como la presencia de un alto potencial de evaporación, son factores que afectan la cantidad de agua así como el balance de sales del suelo. Una baja humedad atmosférica, altas temperaturas y la velocidad del viento promueven el movimiento de las soluciones hacia capas superiores del terreno y por lo tanto, provocan la precipitación y concentración de las sales en las superficies (FAO, 2005). Se pueden distinguir dos principales ciclos de acumulación de sales ciclos naturales y antropogénicos. Los ciclos naturales incluyen los ciclos marinos, los ciclos continentales, el desarrollo de infiltraciones salinas en ciclos artesianos y de agricultura de temporal.

Los ciclos antropogénicos de salinización son causados por:

- a) Un mal manejo de la irrigación (incluyendo una aplicación insuficiente de agua en el campo, irrigación con agua salina o agua con una calidad marginal sin un manejo adecuado de los suelos, del agua y de prácticas agronómicas).
- b) Un nivel inadecuado de las tierras.
- c) Temporadas de sequía y posteriormente utilización del suelo para sembrar con la presencia de mantos freáticos poco profundos.
- d) Mal uso de maquinaria pesada y compactación del suelo.
- e) Excesiva lixiviación con drenaje insuficiente; un uso impropio de cultivos y patrones de rotación. Un manejo pobre del suelo y del agua así como la irrigación con agua salina (FAO, 2005).

Características

En condiciones de campo, los suelos salinos pueden ser reconocidos por que los cultivos crecen en manchones y por la presencia de cortezas blancas en la superficie. Cuando el problema de salinidad es moderado, la apariencia de las plantas presenta un teñido azul-verdoso. Por ejemplo, en zonas en las que se cultivan cereales se pueden presentar manchones áridos y plantas con crecimiento truncado cuando éstas crecen en suelos salinos. La extensión y frecuencia de los manchones áridos es a menudo una

indicación de la concentración de sales en el suelo. Si el nivel de salinidad no es lo suficientemente alto para producir manchones áridos, la apariencia del cultivo puede ser irregular en cuanto a su vigor (Abrol *et al.*, 1988).

La salinidad moderada, sin embargo, particularmente si es uniforme a través del campo, puede a menudo ser indetectable ya que no causa un daño evidente más que la limitación del crecimiento. Las hojas de plantas cultivadas en áreas con gran cantidad de sal pueden ser pequeñas y tener un color azul-verdoso oscuro. Las plantas cultivadas en suelos salinos a menudo tienen la misma apariencia que las plantas que crecen con un estrés ocasionado por sequía (Abrol *et al.*, 1988).

Causas de la salinidad

El agua se evapora en estado puro, dejando las sales y otras sustancias en los suelos. Cuando el agua es removida del suelo por evapotranspiración (ET), la concentración de sal en la solución restante del suelo puede llegar a ser 4 a 10 veces mayor que en el agua con que se irrigó originalmente. Cada irrigación adiciona más sal al suelo. La sal permanece en el suelo y se acumula a menos que sea lavada por una cantidad excesiva de agua (Carter, 1975). El desarrollo de los suelos salinos está relacionado con el flujo de las aguas subterráneas. En condiciones de flujo saturado, cuando el contenido de humedad está por arriba de la capacidad de suelo, el agua subterránea es capaz de moverse debido a la influencia de la gravedad. En el sistema de flujo saturado, el exceso de agua subterránea llega a un área de recarga. Al circular el agua subterránea entre las partículas de roca y suelo, una porción se disuelve y son transportadas como sales solubles. El agua subterránea emerge a la superficie del suelo en el área de descarga. Cuando el agua se evapora las sales se depositan en la superficie del suelo. Con el paso del tiempo, las sales se acumulan en el área de descarga y eventualmente la concentración de sal se incrementa de tal manera que el crecimiento vegetal es limitado (Goddard, 2006).

En las prácticas agrícolas, suelos con un drenaje deficiente con el paso del tiempo pueden alterar los niveles en los mantos freáticos y contribuir a la salinización de las tierras cultivables. En la agricultura bajo el esquema de irrigación por aspersión, la tendencia es aplicar agua en la forma más eficiente y económica. La cantidad de agua aplicada en cada irrigación es igual a la cantidad de agua que se pierde por los eventos de evapotranspiración del campo de cultivo. Bajo estas condiciones, y si no se aplica un exceso de agua que permita realizar un lixiviado, las sales se acumularán en el perfil del suelo (Shainberg, 1975).

Para la formación de los suelos salinos, el nivel freático necesita estar cercano a la superficie del suelo para permitir que por acción de la capilaridad emerja el agua subterránea a la superficie. De manera general, el agua debe de estar a 2 metros de la superficie del suelo para que esto ocurra, pero la profundidad crítica (la profundidad por debajo de la cual el agua no puede ascender por capilaridad a la superficie del suelo) varía con la textura del suelo (Goddard, 2006).

El agua subterránea se puede mover también bajo condiciones de insaturación a través de pequeños poros del suelo mediante el proceso de adhesión. Es entonces cuando el contenido de humedad del suelo es cercano a la capacidad de campo, las partículas de suelo podrían ceder moléculas de agua a otras partículas de suelo con bajos niveles de humedad. El flujo insaturado es común alrededor de ciénegas y otros cuerpos de agua. Igual que el flujo saturado, este puede disolver y transportar sales a la superficie del suelo (Goddard, 2006). Una causa del incremento en la concentración de sales, es que el agua con la que se irrigan los cultivos, puede reincorporarse generalmente a la corriente o flujo río abajo, por lo que el flujo va acumulando una cantidad creciente de sales. Esto en sí, es un problema para la agricultura, ya que la concentración de solutos disueltos puede llegar a ser tan alta que provoque que el agua ya no pueda ser utilizada para la irrigación de otros cultivares (Carter, 1975; Abrol *et al.*, 1988).

También la irrigación de un área puede ocasionar problemas en otra zona ya que las sales de un área cultivable con un buen sistema de drenaje pueden llegar a una zona con mal sistema de drenaje en el que finalmente se acumulen. En muchos valles irrigados este tipo de problemas limita la productividad. Las tierras que se localizan cerca de los ríos son las que acumulan principalmente sales que trae disuelta el agua, por lo que la superficie cercana al río se convierte al paso del tiempo en pantanos o riberas con una gran acumulación de sales. Una forma de atenuar dicho problema puede ser el colocar un drenaje artificial en las tierras bajas así como un mejor manejo del agua en toda el área (Carter, 1975; Abrol *et al.*, 1988).

Aunque la acumulación por sales debida a la ET es la principal causa de los problemas de salinidad en la agricultura, existen otras fuentes de acumulación de sal, como puede ser el que algunos suelos de manera natural contengan suficientes sales que limiten o inhiban la producción de cultivares de tipo económico. Algunos de estos suelos son derivados de materiales de tipo salino y algunos pueden contener depósitos naturales de sales. Otros suelos reciben suficiente sal de la brisa marina y con el paso del tiempo se convierten en salinos. La misma naturaleza de los suelos puede contribuir a acrecentar las concentraciones de sales, cuando el agua producto ya sea de la precipitación o irrigación pasa a través de los suelos, el componente salino natural y los minerales son disueltos de manera muy lenta. Al disolverse las sales son transportadas lejos por el agua, el equilibrio entre la fase sólida y la disuelta cambia y un número mayor de sales son disueltas. Las sales de esta fuente son transportadas a un área donde el agua se evapora y las sales se concentran. Aunque las sales de muchos minerales del suelo se disuelven muy lentamente, se calcula que cerca de 2.2 toneladas métricas o más por hectárea pueden ser disueltas en un año de algunos suelos con características de manto sedimentario calcáreo (Carter, 1975). Los suelos salinos son prácticamente inexistentes en regiones húmedas. Esto es porque durante la época de lluvia o durante los procesos de erosión las sales solubles presentes en los materiales del suelo son llevadas o transportadas hacia el agua del manto freático y transportadas hacia los océanos. Por el contrario, los suelos salinos se presentan en regiones áridas, no sólo porque hay menos cantidad de precipitación pluvial que pudiera arrastrar las sales, si no también por las altas tasas de evaporación características de los climas áridos los cuales tienden a concentrar aún más las sales en los suelos y en las aguas superficiales (Shainberg, 1975; Abrol *et al.*, 1988).

Importancia de los suelos en el estrés vegetal.

Debido a que el suelo es el sustrato natural en la mayoría de los cultivos, las propiedades de los mismos tienen una influencia sustancial en la condición de la planta y de los cultivos. El desarrollo vegetal y el éxito en la producción de grano, requieren condiciones del suelo propicias, incluyendo un aporte adecuado de agua y nutrientes. Las condiciones desfavorables en el suelo tienen un efecto adverso en el ciclo de vida de las plantas, algunas veces alterando de manera efectiva su producción (Szabolcs, 1994). Las especies vegetales difieren en su tolerancia a la sal y a algunos iones en específico. También es un hecho que algunos cultivos pueden ser muy tolerantes en un estadio y ser sensibles en otro estadio. Generalmente, las plantas son más sensibles a la salinidad durante la germinación o en las primeras etapas del crecimiento de la plántula. Algunas variedades como el arroz también son sensibles durante la floración y la formación de la semilla (Carter, 1975; Winicov, 1998).

La sal disminuye la capacidad que presenta la planta para obtener agua ya que reduce la energía libre del agua (Manzoor, 1994).

Los efectos directos que ejerce la sal en una planta se pueden dividir en tres grandes categorías:

- 1) Reducción del potencial osmótico de las soluciones en el suelo, lo cual reduce la disponibilidad de agua para la planta.
- 2) Deterioro de la estructura física del suelo, lo cual disminuye la permeabilidad al agua y los gases.
- 3) Una toxicidad ión específica, la salinidad del suelo puede indirectamente afectar el crecimiento vegetal a través de la inhibición de procesos biológicos como la mineralización y nitrificación (Dudley, 1994; Evangelou, 1994; Subbarao y Johansen, 1994).

Los cationes comúnmente asociados a la salinidad son el Ca^{2+} , el Mg^{2+} y el Na^+ , y los aniones son el Cl^- , el SO_4^{2-} y el HCO_3^- . En algunas circunstancias el K^+ y el NO_3^- pueden contribuir a la salinidad, y cuando el pH es mayor de 9, el CO_3^{2-} es un anión importante (Dudley, 1994).

Cuantificación del grado de salinidad.

Debido a que es muy difícil medir la concentración de sales disueltas en el suelo bajo las condiciones de humedad que se presentan en campo, un método simplificado consiste en mezclar una muestra de suelo con suficiente agua para elaborar una pasta saturada y de la solución se mide su conductividad. La cuantificación de la conductividad eléctrica (EC_e) de un extracto a saturación tiene la ventaja de que el porcentaje de saturación está directamente relacionado al intervalo de humedad del campo y al número de iones

conductores de electricidad en solución. Una EC_e de 1.0 corresponde a una concentración de sales de aproximadamente 640 partes por millón (p.p.m.) (Carter, 1975).

La concentración de sales solubles en el extracto saturado tiende a ser la mitad de las que se encontrarían en la parte superior del suelo con la humedad que se tenga en campo y alrededor de un cuarto de las que estarían en solución si la parte alta se encontrara seca. (Abrol *et al.*, 1988).

La salinidad o un suelo salino pueden ser definidos como cualquier solución de irrigación o solución de suelo con una EC de 4 dS m^{-1} (deciSiemens) o mayor (Cramer, 1994), aunque el Comité de la Sociedad de Ciencias del Suelo de Norteamérica disminuyó este valor y estableció que la diferencia entre un suelo no salino y uno salino se puede considerar con un valor de 2 dS m^{-1} (Abrol *et al.*, 1988). La tabla 1 muestra algunas de las unidades empleadas para cuantificar la salinidad.

Tabla 1. Términos, unidades y conversiones en salinidad de suelos		
Símbolo	Significado	Unidades
<i>Salinidad Total</i>		
TDS	Total sólidos disueltos	mg/L ^a ; ppm ^b
EC	Conductividad Eléctrica	dS/m ^c ; mmho/cm ^d ; µmho/cm ^e
<i>Conversiones</i>		
1 dS/m = 1 mmho/cm = 1000 µmho/cm		
1 mg/L = 1 ppm		
^a mg/L = miligramos por litro; ^b ppm = partes por millón; ^c dS/m = deciSiemens por metro a 25° C; ^d mmho/cm = milimhos por centímetro a 25° C; ^e µmho/cm = micromhos por centímetro a 25° C		

Tomado de: Cardon *et al.*, 2004.

Salinidad en México

Se estima que de un 20 a un 30 % de los 5.5 millones de ha de tierras irrigadas en México están afectadas por sal en algún grado, considerando un EC mayor de 4 dS/cm como el indicador básico de un exceso de sales solubles en los extractos de suelo saturado (FAO, 2005). El total de tierra es de 191 millones de hectáreas, de las cuales sólo 25.3 millones de ha son tierra arables. El agua es sin duda el principal factor en todas las actividades productivas. De 1927 a 1976, un total de 1,040 presas fueron construidas, y muchos de los distritos de irrigación (DI) fueron creados durante los pasados 50 años. La extensión de estos distritos de riego son del orden de 10,000 hectáreas para los pequeños, de 30,000 a 100,000 hectáreas para para los de extensión media y de 100,000 hasta 270,000 hectáreas para los distritos grandes. Durante las décadas de los años 1980 y 1990, esta tendencia cambió hacia la construcción de pequeñas unidades de irrigación. Aproximadamente 50 % de la tierra irrigada en el país se localiza en sólo tres estados:

Sinaloa (21%), Sonora (17 %) y Tamaulipas (12 %). Actualmente, la tierra irrigada representa alrededor del 30 % del total de la tierra dedicada a la agricultura, y produce el 50 % de la producción nacional, y un 65 % de las exportaciones agrícolas (FAO, 2005). De los principales distritos de riego, el 25 % de su área cultivada se encuentra afectada por sal, y en algunos casos esta área puede representar hasta un 70% del total, como en el distrito de irrigación del valle de Ciudad Juárez (FAO, 2005).

La irrigación de superficie es prácticamente el único sistema de irrigación usado en los distritos de irrigación en México. La ausencia de herramientas apropiadas para cuantificar los volúmenes de agua utilizados en campos específicos, además de una creencia errónea de que más agua aplicada al cultivo es lo mejor para los cultivos, resultan en una baja eficiencia en todos los distritos de irrigación. Sistemas de irrigación más eficientes y un manejo adecuado del suelo (mantenimiento y nivelado, prácticas de reclamación de suelo si fueran necesarias) son factores adicionales que deberían de ser considerados para incrementar la eficiencia en todo el sistema. La principal fuente de salinidad en los distritos de irrigación es básicamente un manejo pobre del agua, el cual incluye un exceso en la aplicación del agua, agua de baja calidad y un inapropiado o inexistente sistema de drenaje (Tanji, 1995).

México presenta una precipitación pluvial anual promedio de 777 mm, la cual comúnmente es insuficiente para sostener una producción agrícola exitosa en muchas de las tierras del país. La precipitación anual en México presenta valores con un intervalo de menos de 500 mm en el norte (en algunos casos tan bajo como 100 mm), hasta valores de 2,000 mm en el sur (en algunos casos tan alto como 5,000 mm). Esta variabilidad hace necesaria la irrigación para poder sostener la agricultura comercial. La principal fuente del agua de irrigación proviene del agua de superficie (70%) almacenada en embalses, agua subterránea (25%) y agua reusada o tratada (5%). Todo este volumen irriga 6.1 millones de hectáreas con una eficiencia del 50 % (FAO, 2005). La estimación y cuantificación de las tierras afectadas por sal se realiza actualmente mediante el uso de imágenes satelitales, en las que se utiliza como cultivos de referencia al maíz, trigo, algodón y sorgo. Esta información se complementa con un sistema de información geográfica para estimar las áreas pobremente drenadas en los meses críticos de aporte de agua (FAO, 2005).

2.- Respuesta de los vegetales ante el estrés salino.

La respuesta de las plantas frente a un estrés salino es compleja, ya que ésta puede variar dependiendo de las concentraciones de sal, del tipo de iones involucrados, de otros factores ambientales y del estado de desarrollo de la planta (Lyengar y Reddy, 1994).

Los mecanismos adaptativos de las células pueden ser diferentes dependiendo del grado de diferenciación celular y la localización espacial de los tejidos vegetales afectados por un medio externo con una salinidad creciente (Hasegawa *et al.*, 2000).

Estrés salino y la respuesta vegetal

Estrés salino

Una concentración alta de sales provoca un efecto de estrés hipertónico e hiperosmótico, una de las consecuencias más evidentes es la disminución o eliminación del crecimiento en la planta. El estrés es causado comúnmente por las concentraciones altas de Na^+ y Cl^- disueltas en el suelo, por lo que la modificación del estado hídrico provoca de manera inmediata una reducción en el crecimiento (Hasegawa *et al.*, 2000). También puede estar involucrado en la desorganización de la membrana, el surgimiento de especies reactivas de oxígeno, la toxicidad metabólica, la inhibición de la fotosíntesis y la disminución en la adquisición de nutrientes (Yeo, 1998).

El efecto más evidente de la salinidad en los vegetales es el de disminuir su crecimiento, antes de que se presente esta alteración, la salinidad provoca cambios estructurales específicos que perturban el balance hídrico. Estos cambios estructurales específicos incluyen el crecimiento de pocas hojas y con un tamaño pequeño, incremento en la succulencia, adelgazamiento de la cutícula foliar y de las capas de cera de la superficie y desarrollo y diferenciación reducida de los tejidos vasculares entre otros (Lyengar y Reddy, 1994).

Una de las primeras causas en la reducción del crecimiento de los brotes en condiciones de estrés salino se ejerce sobre los tejidos en crecimiento y no en los tejidos diferenciados. La sal puede afectar de manera directa o indirecta a las células de la zona de crecimiento al impedir su división celular o su alargamiento. El crecimiento puede ser afectado de manera indirecta al reducir la concentración de los factores de crecimiento como auxinas, citocininas y giberelinas que llegan a la zona meristemática. La cantidad de fotosintatos que llega a la zona de crecimiento también puede ser menor debido al cierre de los estomas. De manera adicional, el transporte de fotosintatos en el floema puede ser inhibido. La inhibición del crecimiento implica una deficiencia hídrica más que un efecto

adverso directo provocado por los iones sobre el metabolismo. (Lyengar y Reddy, 1994 y Zhu, 2001).

Movimiento de la sal a través de las plantas

El movimiento de sales de las raíces a los brotes es el producto del flujo transpiracional, el cual es requerido para mantener un estado hídrico en la planta. La alteración en la transpiración puede resultar en la acumulación de moléculas con un nivel tóxico para la planta (Hasegawa *et al.*, 2000). Una de las respuestas inmediatas a la salinidad es el cierre de estomas lo cual mitiga el flujo iónico hacia los brotes. Sin embargo, debido a la necesidad de fijación de carbono por parte de la planta, esta es una estrategia de tolerancia de largo plazo insostenible (Yeo, 1998). Las plantas regulan el movimiento iónico dentro de los tejidos para proteger el crecimiento activo y el metabolismo celular. Una forma de controlar el flujo salino hacia los brotes es regular la entrada de iones y su corriente a través de las células del xilema (Hasegawa *et al.*, 2000). Parece que la participación del transporte iónico de tipo simplástico a través de las células epidérmicas y corticales contribuye a la disminución del Na^+ que es liberado hacia el xilema. Sin embargo, a nivel de la endodermis, el movimiento radial de solutos puede darse por una vía de tipo simplástica, ya que las células que constituyen el tejido caspariano establecen una barrera de tipo físico al transporte de tipo apoplástico (Flowers y Yeo 1992).

En las hojas maduras y en las más viejas sometidas a un estrés por sal se ha observado la incorporación de grandes cantidades de iones, los cuales podrían funcionar como un depósito y restringir la deposición de iones en las células meristemáticas que presentan un crecimiento activo y tasa de fotosíntesis grande. Las células meristemáticas, las cuales no están conectadas de manera directa a la vasculatura, están menos expuestas a los iones liberados por la corriente provocada por la transpiración. Por otra parte, el pequeño espacio vacuolar que presentan no les permite el almacenamiento de iones. Un hecho interesante es que el contenido de solutos en los tejidos en los que predominan células con vacuolas pequeñas (como en las zonas meristemáticas) es de tipo de osmolitos orgánicos, y en los tejidos en los que las células presentan una concentración grande de vacuolas el contenido es de tipo iónico (Hasegawa *et al.*, 2000).

Homeostasis iónica

Un ambiente con altas concentraciones de NaCl, provoca una alteración del estado iónico no sólo para el Na^+ y Cl^- sino también para el K^+ y el Ca^{2+} . El Na^+ externo tiene un impacto negativo sobre el transporte de K^+ al interior de la célula. Una concentración alta de NaCl provoca una acumulación de Ca^{2+} , y esto es una respuesta al estrés que puede ser tanto de tipo adaptativo o de tipo patológico (Niu *et al.*, 1995). La homeostasis de iones en ambientes salinos depende en gran medida de las proteínas de transporte transmembranal que permiten el flujo de iones, éstas incluyen ATP aspas que translocan H^+ , ATP aspas para el Ca^{2+} , transportadores activos de tipo secundario y canales (Niu *et al.*, 1995).

Gradiente electroquímico de la membrana plasmática y de protones (H^+).

Debido a que las membranas son las estructuras más importantes en la regulación del contenido iónico de las células, el análisis de su estructura y funciones son necesarias para entender los mecanismos de tolerancia a la sal (Lyengar y Reddy, 1994). El transporte activo secundario y el flujo electroforético que se da a través de las membranas plasmáticas y de tonoplastos son dirigidas por los gradientes de potencial electroquímico de los H^+ que es conformado por las bombas de protones (H^+). El resultado de la función de estas bombas es el de almacenar grandes concentraciones de Na^+ y Cl^- en el tonoplasto o vacuola lo que permite que las concentraciones en el citoplasma puedan tener valores constantes de entre 80 a 100 mM (Hasegawa *et al.*, 2000).

Transporte de Na^+ y Cl^- a través de la membrana plasmática.

El transporte de Na^+ y Cl^- a través de la membrana plasmática en un ambiente hipersalino se puede considerar ya sea inmediatamente después de un choque salino o después del re-establecimiento de la homeostasis iónica. Inmediatamente después de un choque de tipo salino, el gradiente electroquímico de H^+ se altera. La entrada de Na^+ al interior de la célula disipa el potencial de membrana, por lo que se favorece la entrada de Cl^- al mismo tiempo. La entrada de Cl^- requiere la participación de translocadores de tipo simporte $Cl^- H^+$ (Cheeseman, 1988). Datos experimentales de tipo fisiológico indican que el Na^+ compite con el K^+ para entrar a la célula ya que estos cationes son transportados por proteínas comunes. La toxicidad del Na^+ se puede entender ya que el K^+ es un cofactor esencial para muchas enzimas no así el Na^+ . El Na^+ es un ión que se utiliza como osmolito en vacuolas en células que se encuentran en ambientes salinos, esto puede ser una de las razones por las que en las plantas no hayan evolucionado sistemas de transporte que excluyan por completo al Na^+ en relación con el ión K^+ (Chrispeels *et al.*, 1999). La forma en la que el Na^+ entra y su relación con el K^+ se ha establecido de manera fisiológica mediante dos sistemas de transporte, uno en el que se tiene una alta afinidad para el ión K^+ sobre el ión Na^+ y otro de baja afinidad para la relación K^+/Na^+ (Schachtman y Schroeder, 1994). El ión Ca^{2+} puede aumentar la selectividad en el transporte K^+/Na^+ además de que se ha observado que al agregar una concentración adicional externa de Ca^{2+} esta puede suprimir la deficiencia en la toma de K^+ (Hasegawa *et al.*, 2000).

Compartimentalización vacuolar de Na^+ y Cl^-

En células vegetales expuestas a altas concentraciones de NaCl, el Na^+ y el Cl^- son secuestrados hacia la vacuola. La compartimentalización del Na^+ requiere de un transporte dependiente de energía, posiblemente una proteína antiporte Na^+/H^+ . La consecuencia inmediata del incremento del ión Na^+ en la vacuola es su alcalinización. El transporte de Cl^- hacia la vacuola podría estar dado tanto por el potencial de membrana del tonoplasto, el

cual es de +50 mV en el interior, y por un canal o acarreador que acople el Cl⁻ al gradiente de H⁺ (Cheeseman, 1988).

Homeostasis de Ca²⁺

Una de las funciones del Ca²⁺ es permitir la adaptación de las células vegetales a ambientes salinos. Cuando se suministra una concentración adicional de Ca²⁺ al medio externo, se reducen los efectos tóxicos del NaCl, esto podría deberse a que el Ca²⁺ facilita la selectividad de los canales de alta afinidad K⁺/Na⁺ (Epstein, 1998). Un ambiente con mayor salinidad también incrementa la concentración citosólica de Ca²⁺, lo que aumenta la transducción de señales en respuesta al estrés lo cual permitiría una adaptación de las células a las concentraciones crecientes de sal (Bressan *et al.*, 1998).

Endocitosis y tráfico pre-vacuolar

La endocitosis y el tráfico prevacuolar podrían ayudar a compartimentalizar iones. Las prevacuolas podrían ser dirigidas hacia una vía de exocitosis, fusión con el tonoplasto, o retenidas en el citoplasma sin fusionarse a una vacuola central. De hecho, en estudios con células de tabaco en cultivo y adaptadas a concentraciones crecientes de NaCl, se ha observado la presencia de una gran cantidad de pequeñas vacuolas (prevacuolas) (Hasegawa *et al.*, 2000).

Toma de agua y transporte

Una salinidad alta en las células del cortex de raíces de maíz provoca una reducción considerable de la permeabilidad de las membranas al agua. Esta reducción puede llegar a tener un valor de sólo la quinta parte del valor normal (Hasegawa *et al.*, 2000). Puede haber cambios debido al cierre de canales transportadores de agua (acuaporinas) o por un cambio en su número. También se ha demostrado que algunas acuaporinas se fosforilan como consecuencia a este tipo de eventos. Así, el control de la cantidad y actividad de estas acuaporinas puede ser de suma importancia durante el estrés salino (Hasegawa *et al.*, 2000).

Factores de señalización vegetal que promueven la tolerancia a sal en plantas.

Se han identificado una gran cantidad de moléculas de señalización que podrían mediar la adaptación osmótica de los vegetales ante un estrés salino. Se ha predicho que la regulación de la transcripción es importante en el control de la respuesta de la planta frente al estrés salino (Borsani *et al.*, 2003). En este sentido, se han identificado factores transcripcionales con base a su interacción con los promotores de los genes de respuesta a

un estrés de tipo osmótico o salino. Por ejemplo, el factor de transcripción DREB1A interactúa con una secuencia promotora de un elemento de respuesta a deshidratación (DRE, por sus siglas en inglés) que induce la expresión de genes de tolerancia al estrés en plantas de *A. thaliana* (Borsani *et al.*, 2003).

3.- Biosíntesis de osmolitos y osmoregulación

Una respuesta que posiblemente sea universal a los cambios en el potencial osmótico externo es la acumulación de metabolitos que actúan como solutos compatibles, ya que no interfieren con las reacciones metabólicas normales. Una de las funciones de los osmolitos, es que su concentración en el citoplasma es proporcional al cambio osmótico que se presenta en el exterior, lo cual contribuye a la protección de estructuras y el mantenimiento del balance osmótico lo que permite que el agua entre al interior de la célula (o también una reducción de la salida de agua) (Ford, 1984; Ashraf y Harris 2004).

Los metabolitos que funcionan como osmolitos protectores en los vegetales pueden ser aminoácidos como la prolina; azúcares/polioles como la sacarosa, la fructuosa, el glicerol, la trealosa, la rafinosa y metabolitos con carga como la glicina betaina y el dimetil sulfonio propionato (DMSP). La acumulación de estos osmolitos permite intervenir en el ajuste osmótico al disminuir el potencial osmótico interno (Nuccio *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000).

Los solutos compatibles son típicamente hidrofílicos, lo cual sugiere que podrían reemplazar al agua en la superficie de las proteínas, complejos proteicos o en membranas; de esta forma su papel es de osmoprotectores y como chaperonas (de tipo no proteico) de bajo peso molecular. Los osmoprotectores pueden proteger la conformación de macromoléculas en un ambiente iónico cambiante (Lyengar y Reddy, 1994). Los solutos compatibles en grandes concentraciones pueden reducir los efectos inhibitorios que tienen los iones sobre la actividad enzimática y prevenir la disociación de los complejos enzimáticos (Hasegawa *et al.*, 2000).

Los osmoreguladores estabilizan la conformación activa de las enzimas y de esta forma las protege contra cambios conformacionales provocadas por los iones. La osmoregulación asegura un adecuado turgor y volumen de la célula (Lyengar y Reddy, 1994; Ashraf y Harris 2004). Las vías metabólicas de las cuales se originan estos osmolitos se sitúan en la biosíntesis de aminoácidos a partir del ácido glutámico (prolina) o aspartato (ectoina), metabolismo de la colina (glicina betaina) y la síntesis de mioinositol (pinitol) (Hasegawa *et al.*, 2000).

Función de los osmolitos.

Queda claro que frente a un incremento en la concentración externa de sal, las células vegetales acumulan una gran cantidad de osmolitos; sin embargo, su significado o papel real son objeto de un intenso debate. Algunos autores proponen un papel importante y único en la osmoprotección y el ajuste osmótico de la célula. Otros cuestionan dicho papel con los resultados obtenidos en organismos transgénicos en los que la sola acumulación de un producto no promueve una diferencia significativa entre las células transformadas en

comparación con las células no transformadas. Ejemplo de ello es el análisis de una mutante *sos1* de *Arabidopsis* la cual es deficiente para un canal de K^+ y en la cual los niveles de prolina tienen un incremento de hasta dos veces en su concentración respecto del tipo silvestre bajo condiciones moderadas de salinidad. Sin embargo, ambos tipos de plantas fueron no tolerantes al NaCl (Bohnert y Shen, 1999).

Una posible función derivada de la acumulación de prolina en las células es la protección de las enzimas, las membranas y los polirribosomas durante las perturbaciones del medio externo (Hare y Cress, 1997; Hoai *et al.*, 2003). Se ha propuesto que durante la síntesis de los osmolitos también es importante la activación de otras rutas metabólicas y es lo que permitiría la adaptación de las células ante un estrés. El mismo osmolito prolina se puede utilizar de ejemplo. En células con actividad fotosintética y sometidas a un estrés salino se presenta una pérdida del equilibrio entre la captura de luz por los sistemas fotosintetizadores y la utilización de NADPH para la fijación del carbono, lo cual puede alterar el balance de oxido-reducción y promover un evento de fotoinhibición. La síntesis de prolina, seguida de una activación transcripcional de la pirrolín-5-carboxilato-reductasa dependiente de NADPH, podría funcionar como una válvula de protección ya que regeneraría el $NADP^+$ lo cual tendría un efecto protector. La regulación de la producción y degradación de las enzimas involucradas en la síntesis de prolina parecen indicar que el ciclo entre precursores y producto es importante (Hasegawa *et al.*, 2000).

Parece que los osmoprotectores pueden funcionar también como una fuente de poder reductor que se hace necesaria al alterarse el metabolismo y que también se podrían utilizar como fuentes de carbón y nitrógeno una vez que el estrés es mitigado. Los osmolitos compatibles pueden tener más de una función como puede ser la de prevenir la producción de radicales de oxígeno o intervenir con las especies reactivas de oxígeno (Zhu, 2001).

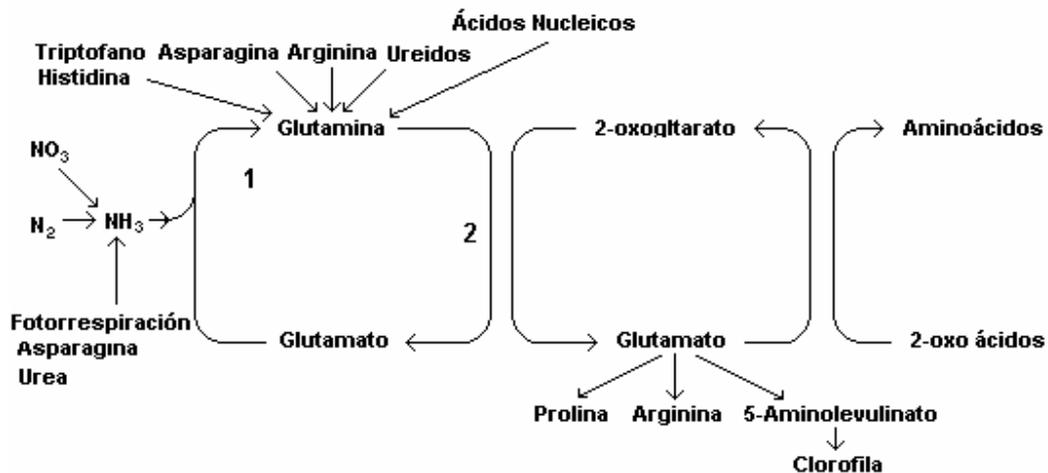
Efecto de la salinidad en el metabolismo del nitrógeno.

El estrés salino en las plantas frecuentemente produce cambios en el metabolismo del nitrógeno (Levitt, 1980), ya que involucra la acumulación de compuestos que contienen nitrógeno tales como aminoácidos libres (alanina, arginina, glicina, serina, leucina, valina y prolina), amidas (glutamina y asparagina), compuestos cuaternarios de amonio (glicinabetaína), poliaminas (putrescina y espermidina) y amonio así como una disminución en el contenido de nitrato (Hoai *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2001; Ashraf y Harris 2004; Parida *et al.*, 2005).

En condiciones de estrés salino el nitrato no solo es necesario para el crecimiento vegetal sino que los metabolitos que se pueden sintetizar a partir de esta molécula participan en el ajuste osmótico (Silveira *et al.*, 2001). Por otra parte el amonio es asimilado por dos vías metabólicas, el ciclo de la glutamino sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) y la vía que involucra a la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) (Hoai *et al.*, 2003).

4.- Asimilación de amonio y ciclo GS/GOGAT

La principal fuente de nitrógeno inorgánico para las plantas es el nitrato el cual es reducido a amonio. Este último, representa la otra fuente de nitrógeno inorgánico, para después ser incorporado en la materia orgánica (Mifflin y Lea, 1980). Actualmente es aceptado que al menos el 90% del amonio en las plantas superiores es asimilado por la vía denominada ciclo de la glutamino sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) la cual se esboza en la Figura 1.



Tomado de: Lea *et al.*, 1989

Figura 1. - Ciclo de la glutamino sintetasa/glutamato sintasa. Se muestra cómo la enzima glutamino sintetasa (1) incorpora amonio para producir glutamina, la cual es a su vez el sustrato de la enzima glutamato sintasa (2) que produce glutamato.

En este ciclo, propuesto en 1974 (Lea y Mifflin 1974), la enzima glutamino sintetasa (GS) actúa en conjunción con la enzima glutamato sintasa (GOGAT) para incorporar iones amonio y una molécula de 2-cetoglutarato y producir glutamato a través de la glutamina a expensas de ATP y poder reductor. La glutamina y el glutamato producidos por el ciclo pueden entonces ser usados para sintetizar todos los otros compuestos que contienen nitrógeno en la planta (Woodall *et al.*, 1996 y Forde y Cullimore, 1989).

El amonio puede provenir de una gran diversidad de fuentes, ya sean primarias (como los iones nitrato y amonio en el suelo o proporcionados a través de las bacterias fijadoras de nitrógeno en los nódulos radiculares) o secundarias (como son los eventos de fotorrespiración en las hojas verdes, el metabolismo de los fenilpropanoides o la desaminación de los aminoácidos en las semillas en germinación) (Forde y Cullimore, 1989; Oliveira *et al.*, 2002).

El amonio también puede ser liberado, para su reasimilación por el tejido radicular, de los compuestos transportadores de nitrógeno (reacciones 9 y 12) y a través de la descomposición de los compuestos nitrogenados durante el envejecimiento, especialmente de la degradación de proteínas y purinas (reacciones 7 y 8).

Varias de estas vías tienen el potencial de involucrar grandes cantidades de amonio, y pueden presentarse durante un estadio específico del desarrollo o variar entre los diferentes órganos que componen a la planta. Por ejemplo, pueden estar restringidas a un solo tipo de tejido, como puede ser la fijación del nitrógeno en las raíces o en los nódulos, o bien, se pueden presentar en más de una clase de tejido como pueden ser bajo las condiciones que promueven o disminuyen la fotorrespiración (intensidad luminosa, temperatura, concentración de CO₂ y O₂). Los cambios en el desarrollo que involucran la removilización y distribución de los recursos vegetales también producen nuevas pozas de amonio como en el florecimiento, la formación de la semilla y la senescencia (Woodall *et al.*, 1996; Linka y Weber 2005). Existe evidencia de que el amonio es fitotóxico, por lo que la asimilación del amonio podría verse además como una detoxificación. Por consecuencia, mientras que el nitrato puede ser transportado a través de la planta del sitio de asimilación y puede ser almacenado llegando la acumulación a concentraciones milimolares, no existe evidencia que muestre que el amonio sea normalmente transportado y por lo tanto debe ser asimilado en donde éste surge (Woodall *et al.*, 1996; Canovas *et al.*, 2007).

4.i.- Glutamino sintetasa (E.C. 6.3.1.2.)

En los vegetales, las enzimas glutamino sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH) tienen un papel importante en la asimilación del amonio derivado entre otros eventos de la nutrición mineral, de la fijación biológica del nitrógeno, la fotorrespiración y el catabolismo de los aminoácidos tales como la arginina o la prolina (Limami *et al.*, 2002; Biesiadka y Legocki, 1997). La importancia de la (GS), se hace cada vez más evidente, ya que es la principal enzima encargada de la asimilación de amonio en plantas superiores, además de tener un papel clave en todos los aspectos del metabolismo del nitrógeno en la germinación y desde la formación de la semilla hasta la senescencia. Las isoformas de GS son esenciales para la asimilación de todas las fuentes principales de amonio, ya sean abastecidas directamente del suelo o producidas por la fijación del nitrógeno atmosférico. El nitrato derivado del suelo puede ser transportado a través de la planta y almacenado; eventualmente se reduce a amonio y es asimilado por la GS del cloroplasto, o en algunas ocasiones por la GS citosólica. Esta última isoforma se requiere para movilizar el nitrógeno de los cotiledones en las plántulas en germinación, así como de los órganos de almacenamiento, nódulos y tejido senescente, reasimilando el amonio derivado principalmente de la degradación proteica (producida posiblemente a través de la actividad desaminativa de la enzima glutamato deshidrogenasa GDH) para proveer nitrógeno en una forma en que pueda ser transportado a los sitios de crecimiento activo. En estos sitios de crecimiento activo la participación de la GS puede ser requerida de nuevo para reasimilar el amonio liberado por los compuestos transportadores de nitrógeno y sus enzimas asociadas como pueden ser la arginasa, asparaginasa o glutaminasa, para producir ya sea glutamina o glutamato para uso intracelular. Además de estos aspectos claves del metabolismo vegetal tenemos la liberación de grandes pozas de amonio a través de otras vías, especialmente la fotorrespiración y la vía de los fenilpropanoides. Las isoformas de GS son de nuevo responsables de este evento de reasimilación en las plantas superiores (Woodall *et al.*, 1996). El estudio molecular de la enzima comienza en 1983 con la clonación y secuenciación del gen estructural (*glnA*) de la GS de la cianobacteria *Anabaena* realizada por el equipo de Tumer y colaboradores (1983). Desde entonces, se ha avanzado en el conocimiento de esta importante enzima para el metabolismo del nitrógeno en todos los organismos.

Presencia, distribución y localización

Presencia

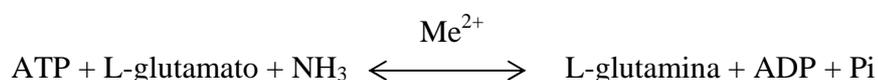
Se puede decir que GS tiene un papel dual con dos reacciones bioquímicas esenciales: la asimilación de amonio y la formación de glutamina. La glutamina producida por la enzima es esencial para la síntesis de proteínas y su nitrógeno amido es donado para sintetizar una gran variedad de metabolitos esenciales. Desde el punto de vista de su función de tipo central se puede considerar como importante. Se ha propuesto que el gen

que la codifica es uno de los más antiguos (Kumada *et al.*, 1993; Pesole *et al.*, 1991). Por lo mismo se le puede localizar en todos los dominios (*archaea*, *eubacteria* y *eucaria*) (Pesole *et al.*, 1995).

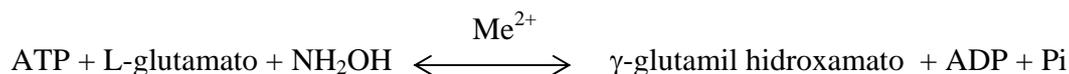
Reacciones catalizadas

La GS purificada puede llevar a cabo los siguientes tipos de reacciones *in vitro*:

I La de tipo biosintético o de síntesis de glutamina, en la que a partir del glutamato y con gasto de ATP incorpora una molécula de amonio (Me^{2+} = metal divalente como Mg^{2+} o Mn^{2+}).

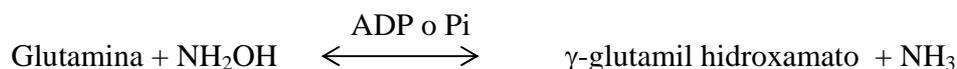


II Ensayo de “sintetasa”. La hidroxilamina como sustrato en lugar del amonio produce γ -glutamil hidroxamato.

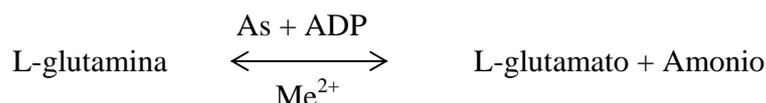


Esta reacción también es de tipo biosintético y existe evidencia de que la K_M y la V_{\max} de la enzima con hidroxilamina son similares a las del amonio además de que la afinidad para otros sustratos no se ve afectada. Por ello, esta reacción se emplea para medir la actividad ya que la formación del producto se puede seguir de manera espectrofotométrica (O'Neal y Joy, 1973).

III Ensayo de transferasa. La glutamino sintetasa también cataliza la transferencia del γ -glutamil al formar γ -glutamil hidroxamato a partir de la glutamina y de hidroxilamina.

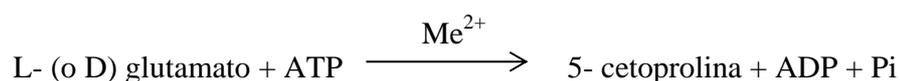


IV La enzima también puede catalizar la arsenólisis de la glutamina. Esto se consigue cuando se incuba con L-glutamina e iones metálicos divalentes; la reacción produce L-glutamato y amonio



En la reacción pueden intervenir el Mg^{2+} o el Mn^{2+} . Con este último la velocidad de la reacción es más rápida, e inclusive se ha reportado que puede ser igual a la velocidad de la actividad de sintetasa de la enzima (Stewart *et al.*, 1980).

V En ausencia estricta de amonio y con ATP como sustrato, la glutamino sintetasa cataliza la formación de 5-cetoprolina a partir de glutamato. La velocidad de formación de 5-cetoprolina es baja, alrededor de 0.1 % del total de la reacción de síntesis que emplea L-glutamato y amonio (Stewart *et al.*, 1980).



Distribución en los tejidos

La enzima se encuentra distribuida a través de toda la planta. Se ha demostrado su presencia en extractos de semillas, plántulas, ápices, raíces y nódulos radiculares, sin embargo su actividad puede variar marcadamente de un tejido a otro (Woodall *et al.*, 1996).

Isoformas de glutamino sintetasa

La presencia de múltiples formas de glutamina sintetasa separadas por la metodología de cromatografía de intercambio iónico, hizo que en un principio se adoptara una nomenclatura para la enzima citoplásmica la cual parecía ser eluida primero a una baja concentración de KCl debido a su carga neta, por lo que se le denominó GS₁. La enzima localizada en cloroplasto era eluida posteriormente por lo que recibió la denominación GS₂. Actualmente, se ha demostrado que la enzima cloroplástica puede llegar a eluir antes que la citosólica en muchas especies vegetales; es por eso que autores como Woodall y colaboradores (1996), recomiendan que se mencione como GS citosólica y GS cloroplástica en lugar de GS₁ y GS₂, ya que es incorrecto y se puede prestar a confusiones (Biesiadka y Legocki, 1997).

Los análisis de tipo comparativo entre las dos isoenzimas de cebada y maíz han mostrado que tienen una diferente estabilidad térmica, pH óptimo, así como afinidad por el glutamato y el ATP (Forde y Cullimore, 1989). Aún más, estudios de tipo inmunológico han mostrado que las dos isoenzimas en una amplia variedad de especies vegetales difieren en sus determinantes de tipo antigénico. Una estimación del peso molecular de las enzimas cloroplástica y citosólica sobre la base de su separación mediante electroforesis indica que las subunidades cloroplásticas son ligeramente más grandes (43-45 kDa) (LSU, por sus siglas en inglés: large GS subunit) que sus homólogas citosólicas (37-43 kDa) (SSU, por las siglas en inglés: small GS subunit) (Hirel *et al.*, 1987 y Woodall *et al.*, 1996).

Localización subcelular

Como se ha mencionado líneas arriba, existen diferentes isoformas de GS en plantas superiores las cuales son cloroplástica y citosólica. En las especies vegetales que han sido estudiadas tales como arroz (Zhao y Shi, 2006), *Arabidopsis* (Oliveira y Coruzzi, 1999) chícharo y frijol (Woodall *et al.*, 1996) entre otras, la enzima parece estar codificada por una familia multigénica con un mínimo de cuatro genes nucleares que codificarían para una enzima cloroplástica y al menos tres polipéptidos de tipo citosólico (Woodall *et al.*, 1996).

Isoenzima citosólica

La GS citosólica se localiza a través de toda la planta; sin embargo, es comúnmente más abundante en las raíces y en los nódulos radiculares de las leguminosas en donde se requiere de una alta actividad de GS para competir con la gran cantidad de flujo de amonio producido durante la fijación del nitrógeno. En sí, los nódulos contienen uno de los más altos niveles de actividad de GS encontrados en cualquier tejido vegetal, e inclusive llega a representar hasta el 2% de la proteína soluble total (Woodall *et al.*, 1996).

a) Nódulos radiculares.- Los nódulos radiculares de las leguminosas son una de las fuentes más ricas de GS en plantas superiores, por lo que no es sorprendente que la enzima de esta fuente haya sido estudiada con gran detalle. Como se ha mencionado líneas arriba, la GS de los nódulos puede llegar a representar del 1 al 2% de la proteína soluble y llegar a representar hasta el 95% de la actividad citosólica de la planta; el resto puede ser de tipo plastídico o pertenecer a los bacteroides de *Rhizobium*. La actividad de GS de los bacteroides fijadores de nitrógeno es muy baja, así que el amonio generado por la actividad de la enzima nitrogenasa es excretado hacia el citosol vegetal para ser asimilado por las enzimas vegetales. Lara y colaboradores (1983) han reportado que la GS de nódulos puede ser separada mediante cromatografía de intercambio iónico en dos isoenzimas a las que denominaron GS_{n1} y GS_{n2}. Algo destacable es que la isoenzima GS_{n2} fue indistinguible de la enzima citosólica radicular (GS_r) con base a características antigénicas de tipo reacción cruzada, así como por características de tipo físico y propiedades cinéticas. El análisis de los polipéptidos citosólicos de *P. vulgaris* de raíces, hojas y nódulos ha hecho posible la identificación de los mismos designándolos como α , β y γ , los cuales tiene pesos moleculares similares (estimados en 43 kDa) pero que difieren en sus puntos isoeléctricos. GS_{n2} consiste principalmente de subunidades de tipo β , mientras que GS_{n1} se encuentra compuesta por subunidades β y γ en donde esta última parece ser el principal constituyente. Al realizar un análisis mediante una electroforesis en gel nativo de poliacrilamida de las isoenzimas nodulares de *P. vulgaris*, se encontró que la actividad se podía resolver en dos bandas principales y si esa misma región del gel era teñida para identificar proteína se revelaban de 6 a 9 bandas; esto sugiere la posibilidad de que las subunidades β y γ fueran ensambladas en diferentes proporciones para producir una gama variada de formas hetero-octaméricas. La existencia de estos heterómeros γ/β ha sido confirmada posteriormente por otros grupos de investigación (Forde y Cullimore, 1989).

Las diferentes subunidades de GS se pueden ensamblar para formar una variedad de isoenzimas hetero-octaméricas. Esto puede tener implicaciones para la función de la enzima ya que podría ser que el sitio activo de las enzimas de plantas superiores estuviera formada por la combinación de “medios sitios activos” donados por las subunidades adyacentes. Por lo tanto, los hetero-octámeros podrían tener propiedades cinéticas que fueran diferentes a las de sus contrapartes homo-octaméricas (Forde y Cullimore, 1989; Fu *et al.*, 2003).

b) Raíces y hojas.- La evidencia disponible indica que hay poca o ninguna diferencia entre las enzimas citosólicas de raíz y de hoja. Las propiedades cinéticas y regulatorias de la GS de los tejidos radicular y foliar de cebada y arroz fueron idénticos. Por otra parte, se encontró que en el frijol las isoenzimas de raíz y hoja se encuentran compuestas por los mismos polipéptidos citosólicos (α y β). En chícharo los polipéptidos GS₁ y GS_n están presentes ya sea en hojas o en raíces, sin embargo el polipéptido GS₁ es el que predomina en las raíces (Tingey *et al.*, 1987).

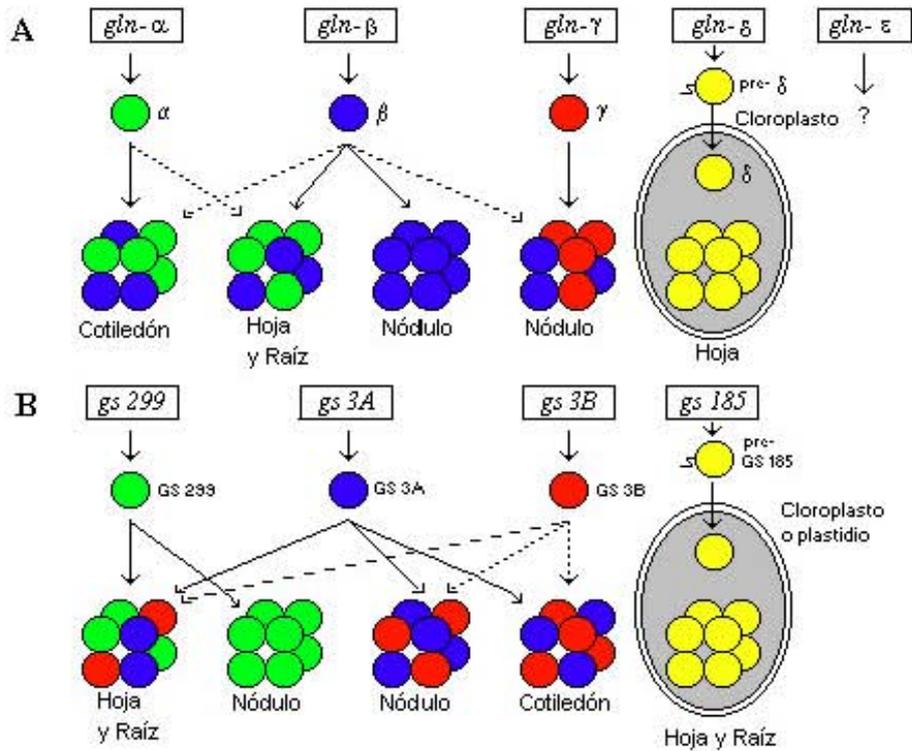
c) Otros órganos vegetales.- Existen pocas investigaciones en otros órganos vegetales. Sin embargo, el equipo de Pushkin y colaboradores (1981) encontraron que la GS citosólica de semilla de chícharo presenta un inusual alto peso molecular (520 kDa) comparado con el de la enzima de hoja (384 kDa) e inclusive las subunidades tiene un peso de 64 kDa en lugar de los 48 kDa encontrado en su contraparte foliar; aunque estos datos están en conflicto con los encontrados por otro grupo de trabajo que reportan un peso para las subunidades de la semilla de chícharo de 45 kDa (Forde y Cullimore, 1989).

Isoenzima cloroplástica

Las subunidades de la GS cloroplástica en *Phaseolus vulgaris* y en tabaco han sido separadas en cuatro variantes con diferentes puntos isoeléctricos. También se ha encontrado evidencia de que la enzima de tabaco se encuentra glicosilada (Nato *et al.*, 1984), lo que muestra la posibilidad de que ciertas diferencias en el patrón de glicosilación podrían contribuir a la existencia de variantes con diferentes cargas eléctricas. Sin embargo, otros investigadores no han podido confirmar los patrones de glicosilación para la glutamino sintetasa cloroplástica de espinaca, chícharo o *Nicotiana plumbaginifolia* (Tingey *et al.*, 1987). Otras modificaciones post-traduccionales (tales como fosforilación o una proteólisis limitada) o inclusive artificios surgidos durante la extracción enzimática, podrían explicar la heterogeneidad en la enzima cloroplástica (Lightfoot *et al.*, 1988). A pesar de que estudios de tipo Southern blot indican que solo existe un gen que codifica para las subunidades de la enzima cloroplástica en *P. vulgaris*, se han reportado dos variantes de tamaño para las subunidades de la misma especie e inclusive se han detectado variantes similares después de una importación *in vitro* para un solo precursor polipeptídico en cloroplastos aislados; se piensa que esas diferencias pueden ser el resultado del uso de dos diferentes sitios de corte por parte de una peptidasa (Lightfoot *et al.*, 1988).

Organización génica y estructura

Actualmente está bien establecido que para las plantas superiores (y en estudios más detallados se ha confirmado con *P. vulgaris* y *Pisum sativum*) glutamino sintetasa está codificada por una pequeña familia multigénica. La expresión de los diferentes genes que codifican a la GS permite suponer que la enzima podría estar conformada por un solo tipo de subunidades o por una combinación que daría origen a una enzima de tipo heterooctamérico (figura 3) (Woodall *et al.*, 1996; Zhao y Shi, 2006).



Tomado de (Woodall *et al.*, 1996)

Figura 3.- Expresión de glutamino sintetasa en *Phaseolus vulgaris* (A) y *Pisum sativum* (B). La figura muestra los genes que codifican para las distintas isoformas y como las subunidades podrían ensamblarse dando origen a enzimas mono o heterooctaméricas de glutamino sintetasa tipo 1.

Regulación

La actividad de GS en las células vegetales puede ser regulada a diferentes niveles

- 1.- Transcripción de la familia génica.
- 2.- Procesamiento y estabilidad del ARNm.

- 3.- Traducción
- 4.- Localización subcelular, procesamiento o modificación de los polipéptidos primarios de GS.
- 5.- Ensamble de la enzima octamérica.
- 6.- Modulación de la actividad de la holoenzima.
- 7.- Degradación de la enzima.

Regulación durante el desarrollo

Existe considerable información de varias especies de plantas superiores de que la familia génica que codifica para GS es expresada de manera diferencial durante el desarrollo así como en los diferentes órganos que integran a la planta. Se ha observado una variación tanto de los ARNm como de los diferentes polipéptidos que integran a las isoenzimas. Por ejemplo, en raíces la GS que predomina es la de tipo citosólica la cual parece ser similar, pero quizá no idéntica, a la GS citosólica de hojas (Woodall *et al.*, 1996).

Por otra parte, en el tejido foliar, la isoenzima localizada en el cloroplasto denominada GS₂ es comúnmente más abundante que la citosólica en las hojas de muchas de las plantas superiores. Sin embargo, en una primera aproximación para determinar el papel de la actividad de las isoformas de GS el grupo de McNally y colaboradores en 1983 estudiaron una gran cantidad de especies vegetales encontrando patrones interesantes entre las proporciones de GS citosólica y GS cloroplástica, lo que les permitió sugerir que podrían existir cuatro agrupaciones naturales de acuerdo a la estrategia fotosintética de los vegetales estudiados, a saber: grupo A, en el que se integrarían plantas que presentaron solo actividad de GS citosólica en su estudio; grupos B y C contienen solo o de manera predominante actividad de GS cloroplástica. Estas especies fueron principalmente plantas de tipo C3. Grupo D en el que predominaron plantas de tipo C4 y leguminosas tropicales. Sin embargo, algo que hay que destacar es que las plantas C4 presentan un mecanismo auxiliar para la fijación del carbón el cual incrementa la concentración del CO₂ en la proximidad de la enzima rubisco, previniendo la fotorrespiración y la concomitante liberación de amonio. Sin embargo, a la luz de posteriores estudios en las mismas especies vegetales, queda claro que la agrupación que realizó el equipo de McNally fue una sobre simplificación acerca de las actividades y de la proporción de las isoformas de GS, ya que se realizó sólo en un tiempo dado y no se dio un seguimiento durante el transcurso del desarrollo de las plantas. Estudios posteriores han demostrado que las isoformas de GS son reguladas de manera independiente y pueden cambiar sus propios patrones durante diferentes etapas del desarrollo de la planta y a través de las estaciones. Se ha observado que puede cambiar dramáticamente la proporción de isoforma citosólica respecto de la cloroplástica e inclusive también puede variar en respuesta a diferentes condiciones de crecimiento (Woodall *et al.*, 1996). Por ejemplo, la actividad de la GS citosólica se incrementa y la de la GS cloroplástica disminuye durante los eventos de senescencia en varias especies de árboles de tipo deciduo como el saúco; y, en muchas especies, las variaciones en las temperaturas de crecimiento pueden resultar en diferentes perfiles de las isoformas de GS (Woodall *et al.*, 1996).

Regulación de la actividad

En plantas superiores las fuentes de iones amonio para la actividad de GS son dependientes en gran medida de parámetros ambientales. Por ejemplo, la fuente de nitrógeno para la planta (ya sea nitrato o amonio), determina en primer lugar, la vía en la cual el amonio es presentado a GS; segundo, la localización celular y subcelular de la producción del amonio y tercero, la velocidad de asimilación del amonio requerido. Además, en los tejidos fotosintéticos la luz y la concentración de CO₂ afectan la liberación de amonio del evento de fotorrespiración. Más aún, un ataque por parte de patógenos puede afectar la velocidad en la producción de amonio de la vía de los fenilpropanoides. También se realizaron estudios para establecer el efecto de estos parámetros en la regulación de la expresión de los diferentes genes de GS, así como sus polipéptidos e isoenzimas (Forde y Cullimore, 1989).

Aporte de nitrógeno

En bacterias entéricas, ya sea la expresión o bien la actividad de GS se encuentran fuertemente afectadas por el aporte de nitrógeno. Este efecto dual es mediado por la relación glutamina/2-cetoglutarato en la célula y esta señal metabólica es transducida por una cascada de proteínas regulatorias que afectan, entre otros eventos, la transcripción del gen que codifica a la GS, la adenilación reversible de la enzima y como consecuencia una sensibilidad aumentada a una inhibición por retroalimentación. A través de estos mecanismos de control, la actividad de GS es substancialmente incrementada en condiciones de inanición de nitrógeno y es severamente reprimida cuando el amonio se encuentra en exceso (Magasanik, 1988). En plantas superiores, GS no se encuentra adenilada. Un aporte de nitrógeno en plantas superiores tiene un efecto distinto al que se mencionó en bacterias. De acuerdo con la evidencia que se tiene para soya por el grupo de Hirel y colaboradores (1987), los genes que codifican para la GS citosólica se inducirían más que reprimirse por un aporte de amonio externo. Por otra parte, en plantas que presentan nodulación se ha registrado una intensa actividad de la glutamino sintetasa debido al aporte de amonio resultado de la fijación de nitrógeno (Harrison *et al.*, 2003). Asimismo se tiene que considerar que el amonio no es el principal efector directo que induciría la expresión de los genes de GS, sin embargo, la fuente de nitrógeno sí modifica su expresión de una manera indirecta al modificarse la velocidad de fijación de nitrógeno o la reducción del nitrato entre otros eventos (Forde y Cullimore, 1989)

Otros experimentos que han ayudado a establecer esta regulación por nitrógeno externo se han realizado haciendo fusiones génicas en las que se utilizó el promotor de GS unido a un gen que funciona como reportero, en este caso el de la β -glucuronidasa (GUS). En plantas de trébol transgénicas se pudo demostrar que hubo un incremento de tres veces la actividad de la enzima GUS en plantas a las que le fue adicionado 10 mM de amonio, mientras que la aplicación de nitrato, asparagina o glutamina tuvo muy poco o nulo efecto (Marsolier *et al.*, 1993).

Fotorrespiración

El evento fotorrespiratorio involucra la actividad de oxigenasa de rubisco (ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa) y tres organelos celulares (cloroplasto, mitocondria y glioxisoma). Aunque es iniciada en los cloroplastos por la reacción de oxigenasa de la rubisco, la fotorrespiración resulta en la liberación de amonio en la mitocondria. La reasimilación de este amonio es crucial, así como la cantidad de amonio liberado; aparte de que puede ser potencialmente tóxico y puede fácilmente exceder el que se adquiere por asimilación de tipo primario ya que, como se ha indicado, las plantas superiores presentan dos tipos de isoenzima de glutamino sintetasa (cloroplástica y citosólica) en tejido foliar, por lo que en un principio fue difícil establecer cual isoforma era la responsable de la reasimilación en la fotorrespiración (Woodall *et al.*, 1996). Esencialmente la liberación de amonio se da en la mitocondria cuando se convierte en serina la glicina; el amonio resultante es liberado para ser reasimilado, por lo que parecía lógico suponer que la isoenzima citosólica fuera la responsable para este evento. De hecho, así fue esbozado en la propuesta original (Lea *et al.*, 1989). Queda claro que la glutamino sintetasa cloroplástica es la involucrada, ya que se han usado mutantes de cebada que no pueden realizar la fotorrespiración y que carecen de la enzima, las cuales solo son viables cuando se suprime la fotorrespiración (Woodall *et al.*, 1996). Se ha establecido que en las hojas de las plantas de tipo C3, la cantidad de amonio derivado de la fotorrespiración es cuantitativamente el principal flujo de nitrógeno dentro del metabolismo vegetal (Lea, 1990). Recientemente se han publicado datos de una forma mitocondrial de la enzima (Linka y Weber 2005; Taira *et al.*, 2004) de ser así, el papel fisiológico de esta isoforma de glutamino sintetasa tendrá que ser examinado cuidadosamente.

Luz

Se ha observado que en muchas plantas especialmente de tipo C3, la luz incrementa el nivel de la isoenzima cloroplástica con relación al de la GS citosólica. Parece ser que el incremento se debe a una síntesis de la proteína *de novo*. Se ha evaluado el efecto de la luz en la expresión del gen de la GS cloroplástica y se ha visto que puede llegar a aumentar hasta 20 veces el ARNm de hojas previamente etioladas. Parece ser que la inducción está regulada en parte a través del cromóforo fitocromo. También se reporta un comportamiento en el que se acumula ARNm de GS en la oscuridad, al cual precedió un pulso de luz roja, similar al que se presenta para los genes nucleares *rbsC* y *Cab*, los cuales también codifican para proteínas cloroplásticas. La expresión regulada por luz del ARNm de la GS cloroplástica es más complicada que una respuesta mediada directamente por fitocromo así como por el efecto de la luz roja; por lo pronto, los resultados obtenidos parecen indicar que se necesita de cloroplastos maduros (Forde y Cullimore, 1989; Oliveira y Coruzzi 1999).

Senescencia y removilización de nitrógeno

Durante la senescencia de la hoja existe un gran cambio en la composición de las proteínas en las que muchas comienzan a ser degradadas y otras incrementan su abundancia. El cloroplasto es el principal sitio del catabolismo ya que sus proteínas involucran la fotosíntesis, especialmente rubisco la cual puede contribuir con 90% del nitrógeno reabsorbido y rápidamente declinar junto con el contenido de clorofila y la función fotosintética. El nitrógeno derivado de las proteínas y otras biomoléculas es reabsorbido por la planta, lo que resulta que en ocasiones hasta un 80% del nitrógeno sea reabsorbido antes de la abscisión de la hoja en árboles deciduos. La síntesis proteica activa es requerida durante la senescencia así como gran cantidad de enzimas de tipo peroxisomal tales como la uricasa, isocitrato liasa y malato sintetasa. La actividad de la GS citosólica se incrementa durante la senescencia (las actividades de GS cloroplástica y la GOGAT disminuyen); existe un cuerpo de evidencia que sugiere que el papel de la GS citosólica es reasimilar el amonio generado por la desaminación de los aminoácidos (en el proceso de la movilización proteica) para proveer de glutamina para un transporte de nitrógeno intercelular más que la producción de glutamato para uso intracelular (Bernhard y Matilde, 1994). Durante la removilización de proteínas en el proceso de senescencia existe un transporte individual de aminoácidos, pero gran parte del nitrógeno es convertido a compuestos transportadores de tipo amido como la glutamina y la asparagina. Se sabe que, en estos eventos, la poza de glutamato se mantiene constante y la poza de glutamina se ve incrementada. La GS citosólica también se ve incrementada en tejidos senescentes y se ha encontrado asociada a tejidos vasculares lo que sugiere que podría tener un papel en la movilización del nitrógeno en la forma de glutamina (Woodall *et al.*, 1996).

Nucleótidos

Varios autores han encontrado que el ADP y el 5'-AMP tienen un efecto significativo en la disminución de la actividad de la glutamino sintetasa e inclusive podrían comportarse como inhibidores de tipo competitivo respecto del ATP. También se ha encontrado evidencia de que el GTP promueve una inhibición de la actividad, la cual fue de tipo no-competitivo con respecto al ATP, pero de carácter mixto respecto al glutamato, aunque la enzima fue preincubada con los nucleótidos por 10 minutos, así que el efecto del GTP podría no ser directo (Kanamori y Matsumoto, 1972). Otros nucleótidos que han probado tener una actividad inhibitoria han sido el CTP y el CMP así como el 5'-AMP. Sin embargo sólo se ha comprobado su acción en las enzimas vegetales ya que las enzimas de hígado de rata y de cerebro bovino no fueron inhibidas de manera apreciable por estos nucleótidos (Meister, 1974). La inhibición ya sea por ADP o AMP indica la posibilidad de control de la enzima por carga energética (Stewart *et al.*, 1980).

Aminoácidos y otros ligandos

La reacción catalizada por la glutamino sintetasa es el primer paso en una compleja y ramificada vía metabólica que permite la síntesis de diversos metabolitos los cuales son los precursores ya sea de proteínas o ácidos nucleicos. Por ésto, algunos compuestos que pueden ser productos finales de una vía también podrían funcionar como potenciales moduladores de la actividad de la enzima. Stewart y Rhodes (1977) encontraron que dos

aminoácidos pueden funcionar como inhibidores de la actividad de GS de *Lemna minor*; estos fueron la alanina y la glicina los cuales se comportaron como no competitivos con respecto al glutamato. Sin embargo Kanamori y Matsumoto (1972) no encontraron una inhibición significativa por aminoácidos incluyendo alanina y glicina en la GS radicular de arroz. Por el contrario, la GS de chícharo ha mostrado una pequeña activación por 2-cetoglutarato; no así su similar radicular de arroz que fue activada hasta en un 50 % con el mismo compuesto más citrato. Esta última enzima fue inhibida por piruvato y glioxilato. Esto podría ser significativo ya que la estimulación se presenta con el 2-cetoglutarato (sustrato para la glutamato sintetasa) e intermediarios que pueden entrar al ciclo de los ácidos tricarbónicos, pero la estimulación no se da con metabolitos que se producen después del 2-cetoglutarato, lo cual puede ser relevante en relación con el control de la actividad en la raíz (Kanamori y Matsumoto, 1972).

El fosfato inhibe la actividad de la glutamino sintetasa de angiospermas de manera similar a como ocurre para la enzima de mamífero. Se trata de una inhibición de tipo competitivo respecto al ATP (Meister, 1974). Sin embargo el papel de estos efectores en cuanto a la regulación de la GS *in vivo*, no es claro. La demostración de esta regulación *in vitro* no implica de manera automática su operación *in vivo* (Stewart *et al.*, 1980).

Subunidades citosólicas

Las secuencias completas de aminoácidos de las subunidades citosólicas de alfalfa, *N. plumbaginifolia*, *P. vulgaris* y chícharo han sido deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos de los ADNc clonados. En un análisis general se tiene que cada subunidad comprende de 355 a 357 residuos y a partir de ello se puede predecir un peso aproximado de 39 kDa. De esta forma la enzima vegetal es más pequeña que su contraparte en mamíferos (373 residuos) o inclusive que la bacteriana (443-469 residuos). Sin embargo, las comparaciones entre estos tres tipos de secuencias han revelado que existe un número de regiones fuertemente conservadas, sugiriendo que las enzimas octaméricas y dodecaméricas han evolucionado de un ancestro común y que tienen estructuras terciarias similares (Forde y Cullimore, 1989). Parece ser que los sitios activos de las enzimas procarióticas y eucarióticas tienen estructuras tridimensionales similares. Es notable que las secuencias que están más conservadas entre las secuencias de GS de mamíferos y vegetales no estén conservadas en las subunidades bacterianas. Esto sugiere que estas regiones tienen un papel en la función enzimática de las formas de tipo octamérico (eucariote). Existe una cisteína esencial localizada en el sitio activo de la enzima de mamíferos y hay evidencia de que hay dos residuos de cisteína en el sitio activo ya sea de la GS citosólica o de la enzima cloroplástica de plantas superiores. Al menos una de las cisteínas o inclusive las dos parecen ser esenciales para la actividad enzimática y la evidencia sugiere que se encuentran localizadas en o cerca del sitio de unión del Mg^{2+} y del ATP. La mayoría de las subunidades citosólicas tienen tres residuos de cisteína (correspondiendo a las posiciones 92, 159 y 179 de la secuencia de *P. vulgaris*). La cisteína que corresponde a la posición 92 es particularmente interesante porque también se encuentra conservada en las secuencias de la GS de *S. typhimurium* y de hámster chino, localizándose hacia el extremo amino del polipéptido y en donde, para la secuencia

bacteriana existe un asa denominada triptofano 57 que forma parte del sitio activo de tipo cilíndrico (Woodall *et al.*, 1996 y Forde y Cullimore, 1989).

Dos líneas de evidencia conllevan a pensar que los residuos de histidina son componentes esenciales del sitio activo de la GS vegetal. Primero, evidencia experimental a partir de estudios con la enzima de chícharo sugieren que la histidina esta involucrada en la unión del glutamato al sitio activo. Segundo, un solo residuo de histidina es el blanco para una modificación de tipo oxidativo en las enzimas procariótica y de mamífero y la pérdida de esta histidina es suficiente para inactivar a la enzima (Forde y Cullimore, 1989)

Subunidades cloroplásticas

El análisis de las secuencias de nucleótidos ha permitido la deducción de las secuencias de polipéptidos que conformarían a la GS cloroplástica en especies como frijol, chícharo, maíz y cebada. El peso molecular deducido del polipéptido es de 47 kDa y es significativamente mayor que el de las subunidades citosólicas ya que presenta una extensión en el extremo amino de por lo menos 60 residuos y hacia el extremo carboxilo una extensión de 16 residuos. También la estructura de la subunidad cloroplástica está altamente conservada con relación a la subunidad citosólica por lo que se cree que presenta tanto un plegamiento como sitios activos similares. La transcripción y traducción *in vitro* de ADNc de GS cloroplástica de *P. vulgaris* ha mostrado que codifica para un polipéptido que es de 3 a 4 kDa más grande que la subunidad cloroplástica madura. Además, en cloroplastos aislados de chícharo se observó que el péptido recién sintetizado de 49 kDa era procesado para obtener un polipéptido de menor tamaño (44 kDa) el cual coemigró en geles bidimensionales con las variantes de carga más básicas de los polipéptidos nativos de la subunidad cloroplástica (Forde y Cullimore, 1989).

Una característica que es específica a las secuencias de las subunidades cloroplásticas de la glutamino sintetasa de monocotiledóneas y dicotiledóneas es que contienen dos residuos de cisteína conservados además de los tres que son comunes para ambas subunidades cloroplásticas y citosólicas. Quizá estos residuos podrían contribuir a las diferentes propiedades cinéticas que presentan las isoenzimas localizadas en el cloroplasto y en el citosol (Forde y Cullimore, 1989)

Estructura cuaternaria

El peso molecular de la glutamino sintetasa en plantas superiores se ha calculado en un intervalo entre unos 350,000 y 400,000 kDa, con un coeficiente de sedimentación (S_{20w}) en intervalo de 14 a 14.5 S y se ensambla a partir de ocho subunidades que pueden variar en cuanto a la proporción de las subunidades de acuerdo a la expresión de los genes que la codifican; ésto hace que se asemeje a la enzima de mamíferos más que a la bacteriana, la cual está compuesta por doce subunidades y con un peso de 50 kDa (Meister, 1974).

Con base en el peso molecular, la estructura de las subunidades y micrografías electrónicas de GS purificada a partir de los nódulos de la planta de soya se ha establecido que la disposición de las ocho subunidades se encuentra conformada por dos conjuntos de tetrámeros planares separados 1 nm, formando una configuración cúbica con dimensiones de aproximadamente 10 nm por lado (Stewart *et al.*, 1980).

Datos recientes acerca de la estructura tridimensional de la glutamino sintetasa de *Phaseolus vulgaris* (Gln α ADNc) generados a partir del procesamiento de imágenes realizado mediante microscopía electrónica, confirman una estructura de tipo octamérica, integrada por dos tetrámeros cada uno compuesto de dos dímeros. Los dos tetrámeros se encuentran colocados “espalda con espalda” y con una rotación de 90° uno respecto del otro. La enzima contiene cuatro sitios activos y cuatro posibles sitios de regulación, lo cual apunta hacia un complejo comportamiento regulatorio (Llorca *et al.*, 2006).

Sin embargo al mismo tiempo otro grupo de investigadores ha reportado la estructura atómica de la glutamino sintetasa de maíz (GS1a), con estudios realizados a partir de la estructura cristalina de la enzima (Unno *et al.*, 2006). Lo interesante es que determinan una estructura decamérica que esta conformada por dos anillos pentaméricos colocados “cara a cara” y con subunidades idénticas; reportan un total de 10 sitios activos, cada uno formado entre dos subunidades vecinas en cada anillo. Reportan un peso de 398 kDa sin iones metálicos o sustratos. Al comparar la estructura de las subunidades encuentran que presentan un 84.2 % de identidad en la estructura secundaria con la glutamino sintetasa de *M. tuberculosis*. Cada sitio activo contiene tres átomos de Mn²⁺

También se ha propuesto que habría sólo cuatro centros de reacción por octámero de enzima, predicción basada en la GS de mamíferos y con base a cálculos estequiométricos de unión de diferentes ligandos tales como L-metionina-S-sulfoximina y Mn²⁺. Sin embargo, estudios de unión de Mg²⁺ a la GS de cerebro, así como ensayos de incorporación de tritio a los grupos sulfhidrilo en la enzima cloroplástica de espinaca y en el marcaje del sitio activo de la GS cloroplástica de la planta de mostaza blanca con ¹⁴C-fosfinotricina y [α -³²P] ATP han dado resultados que son más consistentes con un modelo que presentaría ocho centros reactivos por octámero de glutamino sintetasa (Forde y Cullimore, 1989).

Una situación que es importante destacar es que, como se ha indicado anteriormente, parecía bien establecido que las diferentes isoformas de GS estarían conformadas ya sea por los polipéptidos pequeños (SSU) para el caso de las isoenzimas citosólicas y por los polipéptidos grandes (LSU) para las isoenzimas cloroplásticas, por lo que inclusive en su separación mediante una cromatografía se había designado a la enzima citosólica como GS₁, ya que eluía primero y GS₂ para la isoenzima del plastidio que generalmente eluía posteriormente. Sin embargo, las especies estudiadas no han sido lo más general que se pudiera pensar. Se ha encontrado, por ejemplo, que para la especie rizomatosa perenne *Trientalis europaea* en una extracción realizada a partir de diferentes tejidos e inclusive cloroplastos, la separación de sus componentes mediante una cromatografía y una electroforesis, dieron los siguientes resultados: en la separación cromatográfica el primer pico contenía tanto actividad de GS cloroplástica como citosólica y un segundo pico

detectado solo contenía actividad de tipo cloroplástica. Sin embargo, aunque el primer pico mostró estar integrado por polipéptidos de tipo SSU y LSU como se esperaría, la sorpresa fue que el segundo pico con actividad cloroplástica estuvo completamente integrado por polipéptidos de tipo SSU. Este patrón parece repetirse para otra especie perenne denominada *Pyrola media* (Woodall *et al.*, 1996)

En la estructura de la glutamino sintetasa de *E. coli* se ha confirmado la presencia de Mn^{2+} en una proporción de una molécula por cada dos subunidades. Para la glutamino sintetasa de maíz se ha propuesto que cada sitio activo contiene tres átomos de Mn^{2+} . La estructura atómica determinada por Unno y colaboradores (2006) establece que glutamino sintetasa está integrada por dos anillos de cinco subunidades; los sitios catalíticos se localizan entre cada subunidad adyacente (Unno *et al.*, 2006).

Propiedades catalíticas

Parámetros cinéticos

Los valores aparentes determinados de K_M para los substratos de la GS de diferentes organismos y de diferentes fuentes se muestran en la tabla 5 del *Anexo i*.

Requerimiento de cationes y pH óptimo

Para realizar su función catalítica la glutamino sintetasa de angiospermas exhibe un requerimiento absoluto por cationes metálicos divalentes durante su reacción, los cuales pueden ser satisfechos por el Mg^{2+} y en menor grado por el Mn^{2+} y el Co^{2+} . Varios autores han demostrado que a un mismo pH óptimo el Mg^{2+} y el Mn^{2+} dan resultados de actividades similares en el ensayo de síntesis pero el Mg^{2+} es más efectivo que el Mn^{2+} en el ensayo de transferencia. La naturaleza del catión divalente, su concentración y su relación a la concentración de nucleótidos influye de manera notable en la actividad de la enzima. El pH óptimo para la reacción de síntesis con magnesio se encuentra en una región aproximada a pH 8 y con manganeso en una región alrededor de pH 5 (Stewart *et al.*, 1980). Si se encuentran presentan ambos cationes Mg^{2+} y Mn^{2+} en el ensayo, la actividad depende en gran medida del pH, por lo que la actividad de la enzima *in vivo* podría verse muy afectada por el pH y el contenido de cationes presente en el compartimiento en el que se sitúe a la enzima (Miflin *et al.*, 1981). El tipo de catión divalente también afecta la especificidad hacia los nucleótidos. Así, mientras con el magnesio el ATP es más efectivo, con manganeso el ITP y UTP son más efectivos que el ATP. La presencia de más de un metal catiónico puede afectar de manera considerable la actividad enzimática. De esta forma, el Mn^{2+} y el Ca^{2+} pueden llegar a inhibir la actividad dependiente de Mg^{2+} . Parte de la inhibición producida por el manganeso se puede explicar por su capacidad para ejercer un cambio en el pH óptimo de 8 a 6, valor que se presenta cuando sólo se encuentra Mn^{2+} en la reacción. Kanamori y Matsumoto (1972), reportaron que cationes metálicos como

Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} inhiben fuertemente a la enzima radicular de arroz, hecho que sugieren se puede deber a que reaccionan con los grupos tiol localizados en la enzima.

Mecanismos de Reacción

La glutamino sintetasa puede utilizar ya sea los isómeros L o D del glutamato en la reacción de síntesis, aunque el D-isómero es menos efectivo. Para la reacción de transferencia sin embargo, la enzima es altamente específica para la L-glutamina. A partir de la estructura atómica de la glutamino sintetasa de maíz determinada por el grupo de Unno y colaboradores (2006), proponen un mecanismo de reacción para la transferencia de fosfato. La reacción catalítica de glutamino sintetasa se realizaría en dos pasos. En el primer paso se da la transferencia del grupo fosforilo del ATP a una cadena lateral carboxilada de el sustrato glutamato, produciendo un intermediario activado de γ -glutamil fosfato. En el segundo paso, un enlace del ión amoniaco es desprotonado, formando amonio, el cual entonces ataca al carbono carbonilo del γ -glutamil fosfato y subsecuentemente libera un fosfato libre para producir glutamina (Unno *et al.*, 2006)

4.ii.- Glutamino sintetasa de maíz (*Zea mays* L.)

Genes de GS de maíz

El genoma de maíz contiene la familia génica más grande de glutamino sintetasa (por lo menos seis genes) descrita en la actualidad para plantas. Cinco de ellos codifican para isoformas de GS de tipo citosólico. Los cinco genes de GS1 de maíz exhiben cuatro distintos patrones de expresión durante el desarrollo, dando soporte a la idea de que la regulación diferencial es una razón importante para los múltiples genes de GS1 en las plantas (Sukanya *et al.*, 1994, Unno *et al.*, 2006).

Los genes de la glutamino sintetasa de maíz han sido estudiados fundamentalmente por dos grupos de trabajo. El primero de ellos es encabezado por el Dr. Peter Snustad de la Universidad de Minnesota y el segundo está encabezado por el Dr. Tatsuo Sugiyama de la Universidad de Nagoya en Japón. Ambos grupos han obtenido las secuencias de los 6 genes de GS de maíz con diferentes estrategias.

El Dr. Snustad logro obtener varias clonas de ADNc mediante una selección genética al rescatar una mutante de *E. coli*, $\Delta glnA^-$, con una biblioteca de ADNc de maíz. Obtuvo cinco clonas las cuales codifican para isoformas citosólicas de GS (denominados GS1-1, GS1-2, GS1-3, GS1-4 y GS1-5) y una última que codifica para una isoforma plastídica (denominada pGS202) (Snustad *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1993). Una característica que observa este grupo de trabajo respecto de los ADNc que obtienen, es que presentan hacia el extremo 5' pequeños marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) de 29 codones de longitud separados por 37 pares de nucleótidos del principal marco abierto de lectura. Estos pequeños ORFs no fueron esenciales en el rescate funcional de la mutante de *E. coli*. El grupo ha demostrado que la expresión de los seis genes de maíz exhibe cinco patrones diferentes de expresión. Los resultados son consistentes con la idea de que los múltiples genes de GS de las plantas facilitan la regulación diferencial de la síntesis de GS en varios tejidos en respuesta a los diferentes requerimientos para la asimilación del amonio (Sukanya *et al.*, 1994).

Cuatro años más tarde, el segundo grupo de trabajo obtuvo también clonas de ADNc utilizando una biblioteca elaborada a partir de hojas de maíz (Sakakibara *et al.*, 1992a). La estrategia fue diferente ya que se partió de la expresión del ADN en un vector de expresión lambda GT11 y se identificó a una clona como positiva con un anticuerpo elaborado contra la isoenzima GS1. Esta clona se utilizó como sonda a su vez y se lograron identificar 30 clonas las cuales se agruparon por sus características en cinco grupos y de estos, aquellas que tuvieron los fragmentos más grandes se secuenciaron e identificaron como se muestra a continuación:

Isoformas citosólicas

Nomenclatura Original Sakakibara <i>et al.</i> , 1992a		Nomenclatura nueva Sakakibara <i>et al.</i> , 1996	Grupo de Snustad Citado en: Li, <i>et al.</i> , 1993
1) pGS107	→	pGS1a	GS ₁₋₄
2) pGS112	→	pGS1b	GS ₁₋₃
3) pGS117	→	pGS1c	GS ₁₋₅
4) pGS122	→	pGS1d	GS ₁₋₁
5) ZMGS12	→	pGS1e	
		p GS134	GS ₁₋₂

Isoforma cloroplástica

1) pGS202	→	pGS202	GS ₂
-----------	---	--------	-----------------

En el año de 1996 el grupo de Sakakibara renombró la nomenclatura original de sus clonas. El ADNc que obtiene para la isoforma cloroplástica es idéntico a la que había reportado el grupo de Snustad (Sakakibara *et al.*, 1992a; Li *et al.*, 1993).

De la secuencia de las clonas se deduce que las regiones codificantes de las cuatro clonas son muy similares entre ellas, pero muestran diferencias hacia la región 3' no-codificante, por lo que posiblemente las cuatro derivaron probablemente de genes homólogos, pero distintos.

Se encontró similitud entre dos pares de secuencias, el par pGS1a/pGS1b y el par pGS1c/ pGS1d los cuales presentan marcos abiertos de lectura de las mismas longitudes *i.e.* 1,068 nucleótidos que codifican para 356 aminoácidos y 1,071 nucleótidos que codifican para 357 aminoácidos, respectivamente. Las cuatro clonas mostraron tener una alta similitud con el gen que codifica para la GS citosólica de *P. vulgaris* pcGS β 1 con valores mayores al 84% de identidad entre las secuencias evaluadas. La similitud entre los pares de genes de la GS de maíz es, para el par pGS1a/pGS1b, de un 99% y entre pGS1c/pGS1d de un 96%. Sin embargo en sus regiones 3' no-codificantes mostraron un nivel más bajo de similitud que llegó a ser de 47% y 58% respectivamente. Esto sugiere que los dos pares pueden ser variaciones de tipo no alélico (Sakakibara *et al.*, 1992a).

A partir de ensayos de tipo Western blot los autores confirman diferencias en los pesos para las isoformas de GS de maíz, 40 kDa para GS₁ y 42 kDa para GS₂. Sin embargo, es interesante notar que desde este primer trabajo, el grupo observa la presencia de un polipéptido presente sólo en raíces y con un peso menor a 40 kDa. al cual posteriormente denominan GSr.

El grupo de Sugiyama también ha demostrado que la expresión de los genes de GS de maíz exhibe patrones diferentes de expresión en diferentes órganos. Así el ARNm correspondiente a pGS1c apenas se aprecia en hojas, el mensaje correspondiente a pGS1d es muy evidente sólo en raíz y para pGS1a y pGS1b presentan una fuerte expresión en todos los tejidos evaluados (hojas verdes, hojas iluminadas por 6 horas, mesocótilo y raíz). Por su parte los transcritos para GS₂ y Fd-GOGAT solo presentaron señal en hojas y para

Fd-GOGAT un poco en raíz al igual que sus respectivos polipéptidos (Sakakibara *et al.*, 1992a).

La regulación de la expresión de los genes de la glutamino sintetasa parece ser compleja y puede mostrar diferentes patrones de comportamiento a diferentes estados fisiológicos de la planta como son el enverdecimiento en los que sólo la clona pGS1a mostró un incremento a lo largo del tiempo, la clona pGS1b parece mantenerse constante en las hojas durante este evento y la señales de las clonas pGS1c y pGS1d apenas son perceptibles e inclusive la señal de pGS1c desaparece a las 48 horas del enverdecimiento. Para la isoforma cloroplástica y la Fd-GOGAT también se incrementan los transcritos de estas dos enzimas. Estudios paralelos sobre la presencia de los polipéptidos correspondientes mostraron una correlación para estas dos últimas enzimas; ya hacia las 12 horas de enverdecimiento se presenta un incremento en la señal correspondiente a la GS2 y la Fd-GOGAT, no así para GS1. Por lo tanto la expresión dependiente de la luz que se observa en este evento podría indicar que la regulación de estos dos genes podría estar controlada coordinadamente al nivel de su transcripción (Sakakibara *et al.*, 1992b).

Propiedades cinéticas de la de glutamino sintetasa de maíz

La tabla 2 presenta algunas de las características cinéticas reportadas por investigadores que han estudiado las diferentes isoformas de GS en plantas de maíz.

Isoforma	Sustrato		
	Glutamato (mM)	ATP (mM)	Hidroxilamina (mM)
GS1a ^a	2.9 ± 0.2	ND	
GS1d ^a	3.0 ± 0.2	ND	
GS1 tallo ^b	6.5	2	0.75
GS2 tallo ^b	10	5	2
GS1 hoja ^b	3.5	1.2	0.2
GS2 hoja ^b	5	1.5	0.2
GSp1 ^c	35	0.76	
GSp2 ^c	3.4	0.68	
PPC ^d	34.9		0.2
Endospermo ^d	30.2		5.0
Embrión ^d	2.9		0.3
GS1 ^e	5.2	0.4	–
GS2 ^e	9.8	0.9	

PPC=pedúnculo placento calazal ^a Sakakibara *et al.*, 1996; ^b Ta, 1991; ^c Muhitch, 1989; ^d Muhitch, 1988; ^e Acaster y Weitzman 1985.

Tabla 2. Valores aparentes de K_M de glutamino sintetasa de maíz. Los datos se obtuvieron de diferentes fuentes y corresponden a los tejidos ensayados por los autores.

Glutamino sintetasa y nitrógeno

La mayor parte de la investigación realizada sobre la glutamino sintetasa de maíz parece haber estado encaminada a discernir el papel que desempeña dicha enzima en la incorporación de nitrógeno ya sea a partir de NO_3 o de NH_4 . Los resultados son variados e inclusive contradictorios ya que dependiendo de cómo se plantea la resolución del problema, los investigadores pueden elegir un sistema de plantas completas o con órganos aislados por lo que en ocasiones pueden encontrar respuestas de modulación positiva o no observar ningún cambio.

Glutamino sintetasa y nitrato

Se sabe que en maíz existe una respuesta rápida y transitoria de los transcritos de las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR). Además, algunos de los eventos primarios que se presentan son una síntesis proteica independiente de la expresión de los transcritos (Redinbaugh y Campbell, 1993).

Como se ha mencionado anteriormente, para la glutamino sintetasa se ha demostrado que la expresión de los seis genes de maíz exhibe cinco patrones diferentes de expresión. Los resultados son consistentes con la idea de que los múltiples genes de GS de las plantas facilitan la regulación diferencial de la síntesis de GS en varios tejidos en respuesta a los diferentes requerimientos para la asimilación del nitrógeno (Sukanya *et al.*, 1994).

Los efectos de los diferentes niveles ambientales de amonio y nitrato sobre la expresión de los genes de GS en vegetales permanecen inciertos y parecen ser diferentes dependiendo de la especie y el miembro específico de la familia de GS examinada. Esto es, existen reportes en los que ambos, ya sea nitrato o amonio, parecen tener un efecto positivo sobre la expresión de los genes de GS en alfalfa, soya, chícharo, frijol, arroz o maíz, por lo que encuentran como modulador positivo a las dos formas en las que se presenta el nitrógeno y la respuesta parece ser que se da a nivel de su transcripción, pero en otros casos sólo se reporta un efecto positivo ya sea para el amonio o bien para el nitrato (Sukanya *et al.*, 1994).

En maíz, Sugiharto y Sugiyama (1992) reportan que se obtiene un incremento en la actividad de GS de hojas después de un tratamiento con amonio, pero no después de un tratamiento con nitrato. Por el contrario, dos grupos de trabajo, el de Sakakibara y colaboradores 1992^a y el de Redinbaugh y Campbell 1993, demostraron que la transcripción del gen de GS2 se incrementa rápidamente en raíces después de tratar a plántulas con nitrato, no así con amonio. Redinbaugh y Campbell (1993) mostraron que el incremento en el transcrito de GS2 se presentaba a los 30 minutos de exposición ante el nitrato en presencia de cicloheximida indicando que la regulación positiva es una respuesta primaria al nitrato (Sukanya *et al.*, 1994).

Además de exhibir distintos patrones de expresión temporal y espacial, durante el crecimiento vegetal y el desarrollo, los genes de las isoenzimas GS1 y GS2 pueden responder de manera diferente a los niveles de nitrato, amonio o inclusive luz (Sukanya *et al.*, 1994). Se ha encontrado que la expresión del gen de GS2 es regulada de manera positiva por luz en chícharo, frijol y maíz aunque también se ha demostrado que el gen de GS1 de lechuga está bajo el control de un fitocromo (Sakamoto *et al.*, 1990). aunque la mayor parte de los reportes indican que la luz tiene poco efecto sobre la acumulación del transcrito o del polipéptido de GS1 (Redinbaugh y Campbell, 1993).

No sólo es importante tener presente el que las isoenzimas de GS tienen una localización subcelular específica sino que en una planta a escala celular y tisular existe también una diferente compartimentalización. Por ejemplo, maíz es una planta C4; que presenta células de la vaina y células del mesófilo (CM). Las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno se encuentran distribuidas diferencialmente entre estos dos tipos celulares. Las enzimas con una función de asimilación se localizan en las células del mesófilo y las de tipo fotorespiratorio en la vaina (Sakakibara *et al.*, 1992^a). A escala tisular existe evidencia de que por lo menos uno de los genes de GS1 se expresa de manera específica en el floema, en donde su función debe ser importante para la translocación del nitrógeno (Sukanya *et al.*, 1994).

Al nivel de órganos vegetales también parece existir una regulación diferencial para los genes de GS y bajo condiciones con nitrato, como el caso del gen GS1-1 el cual es regulado de manera positiva en raíces, pero no en brotes; en esta parte vegetal otro gen, el GS1-2, responde de manera positiva (Sukanya *et al.*, 1994). Aunque en estas condiciones Sakakibara y colaboradores (1992^a) reportan en ensayos de tipo western la presencia de una nueva isoforma presente sólo en raíces de plántulas de maíz tratadas con nitrato y no con amonio denominada GSr, al respecto el grupo del Dr. Snustad menciona que es importante realizar de una forma adecuada los experimentos ya que los niveles de los transcritos de algunos genes de GS1 pueden mostrar una gran fluctuación durante el día de manera órgano específica, inclusive en las plántulas control. Además de refutar al otro grupo de investigación de que no existe un incremento de los transcritos de cualquiera de los cuatro genes de GS1 que pudiera corresponder con los resultados del polipéptido encontrado, este grupo de la Universidad de Minnesota no pudo localizar la variante GSr (Sukanya *et al.*, 1994).

Para tratar de elucidar la vía de señalización que se pueda dar en los genes que codifican para la asimilación del nitrógeno y que su expresión dependa de nitrato, el grupo de trabajo del Dr. Sugiyama (Sakakibara *et al.*, 1997) utilizó un sistema en el que corta a las hojas de la planta de maíz y hace un seguimiento con marcadores radiactivos para establecer el patrón de señalización en la vía del nitrógeno. Uno de sus objetivos es averiguar si en hoja se puede dar una regulación de GS2 y GOGAT por nitrato. Se sabe que ambas enzimas pueden ser reguladas por la luz. El amonio es asimilado a través de las enzimas nitrato reductasa (NR) o por la nitrito reductasa (NiR) y es convertido a glutamina por GS. El grupo amido tiene movilidad a través de enzimas denominadas glutamina amido-transferasas, para la biosíntesis de precursores de aminoácidos, nucleótidos y otros

compuestos nitrogenados. GOGAT es una amido-transferasa y juega un papel importante al aportar el glutamato, el cual es el sustrato de la GS (Sakakibara *et al.*, 1997).

Maíz es una planta de tipo C4 en la que en sus células del mesófilo (CM) se localizan principalmente las enzimas NR y NiR, por lo que no es sorprendente que el mismo grupo de trabajo haya logrado identificar una acumulación de polipéptidos de GS2 en respuesta a nitrato en este tipo celular. La acumulación en sí se puede deber a una asimilación primaria del amonio a partir de la reducción del nitrato (Sakakibara *et al.*, 1992a).

La respuesta de los genes de GS2 y NR ante un estímulo de nitrato de sodio 16 mM es positiva, ya que se induce un incremento en la transcripción de ambos genes, sobre todo en hojas que fueron colocadas primero en un medio bajo en nitrógeno; el incremento fue de 5 veces para GS2 y de 10 veces para NR

Al analizar la acumulación de los transcritos de varias enzimas del metabolismo del nitrógeno con y sin nitrato, se observa una respuesta favorable con nitrato para GS2 y NR; no así para Fd-GOGAT ni GS1a o NADH-GOGAT. Esto apoya la idea de que el amonio derivado de la reducción del nitrato es asimilado principalmente por GS2 ya que también NiR se localiza en los plastidios ya sea de hojas o raíces. Los autores logran establecer que la transcripción de los genes de la vía del nitrógeno no requiere de la síntesis de nuevas proteínas. Parece ser que el ión calcio es necesario para la expresión de los genes nitrato-dependientes ya que al utilizar agentes que pueden reducir la disponibilidad de este ión en el medio extracelular se observa una reducción en los transcritos de: GS2, Fd-GOGAT, NADH-GOGAT, NR y NiR (Sakakibara *et al.*, 1997).

Al igual que en otras vías de señalización parece ser que se encuentran involucrados eventos de fosforilación que podrían reprimir a los genes involucrados en la formación de glutamina tales como NR, NiR y GS2. En esta primera aproximación sus resultados apuntan a que puede haber un proceso regulado por calmodulina o bien que se encuentren involucradas proteínas cinasas dependientes de calcio e independientes de calmodulina en esta vía (Sakakibara *et al.*, 1997). Continuando con la evaluación del efecto del nitrato sobre la expresión de algunos de los genes que codifican para las enzimas del metabolismo del nitrógeno otros autores han puesto su enfoque hacia las enzimas GS2 y Fd-GOGAT localizadas en plastidios, las cuales no solo se localizan en los cloroplastos y cuya función principal parece ser la reasimilación del amonio producto de la fotorrespiración. También se ubica a estas enzimas en los plastidios de células de tejidos no fotosintéticos como lo es la raíz junto con la enzima NiR, la cual es responsable de la asimilación del nitrato. De nuevo, los reportes acerca de la respuesta de los genes de GS2 y Fd-GOGAT ante el nitrato o el amonio pueden llegar a ser contrarios (Redinbaugh y Campbell, 1993).

Glutamino sintetasa y amonio

Para el caso de GS2 y Fd-GOGAT que se localizan en los cloroplastos de las hojas verdes, estas enzimas parecen importantes en la reasimilación del NH₄ producto de la

fotorrespiración, en la asimilación del amonio producto de la reducción del nitrato y en el catabolismo de los aminoácidos. Como se espera para los genes que funcionan en los eventos de la fotorrespiración, éstos se encuentran regulados por la luz por lo que en plantas etioladas los ARNm de estas enzimas se encuentran en niveles bajos. Sin embargo, también se localizan a estas enzimas en los plastidios de células de tejidos no fotosintéticos junto con la enzima NiR, la cual es responsable de la asimilación del nitrato. De nuevo los reportes acerca de la respuesta de los genes de GS y Fd-GOGAT ante el amonio son contrarios (Redinbaugh y Campbell, 1993). Por ejemplo en un estudio detallado, Cock y colaboradores (1990) no encuentran una respuesta para la glutamino sintetasa de raíces de frijol ante el amonio. En maíz, Sugiharto y Sugiyama (1994) reportan que se obtiene un incremento en la actividad de GS de hojas después de un tratamiento con amonio. Sin embargo, otros autores, al evaluar la inducción por amonio en raíces, encontraron que no hubo respuesta positiva posiblemente debido a que el amonio en las raíces se asimila en el citosol o por vía vascular, por lo que las enzimas involucradas serían la GS1 y la NADH:GOGAT (Redinbaugh y Campbell, 1993).

La respuesta de la familia multigénica de GS ante el nitrógeno requirió de un análisis más detallado por parte del grupo de Sugiyama para tratar de deducir si el polipéptido de la isoforma GSr que originalmente observaron ante la presencia de nitrato estaría codificado por alguno de los genes ya clonados o por un gen no identificado.

Los diferentes genes de GS muestran variación en los patrones de expresión de sus ARNm. Los ARNm de los genes GS1a y GS1b son abundantes y se expresan de manera constitutiva en todos los órganos. Por el contrario los ARNm que corresponden a GS1c y GS1d son expresados principalmente en hojas etioladas y raíces además de que sus niveles se incrementan con la adición de amonio o nitrato al medio de crecimiento (Sakakibara *et al.*, 1996).

Se realizó la inducción de GSr y al mismo tiempo se midieron los cambios en la actividad enzimática durante el tratamiento de raíces de maíz con NH_4Cl 35 mM durante 35 horas. Se observa que GS1 permanece constante y a partir de la 6ª hora se ve la inducción del polipéptido correspondiente a GSr. Esta presencia tiene una contraparte al hacer los ensayos de actividad enzimática, en los que se evalúan dos tipos de reacción para GS, de síntesis y de transferencia. En el ensayo de transferencia casi no hay aumento de dicha actividad y en el de síntesis se observa un incremento en la actividad conforme transcurren las horas, por lo que los autores argumentan que casi el total de la actividad de tipo de síntesis es producto de GSr (Sakakibara *et al.*, 1996).

Al evaluar la respuesta diferencial de los genes citosólicos de las isoformas de GS ante el amonio y analizar el nivel de su transcripción GS1a y GS1b se encontró un incremento en las primeras horas seguido de una disminución.

Para el caso de la transcripción de GS1d y GS1e su inducción se da desde la 1ª hora alcanzando el máximo hacia la 6ª hora, por lo que parece existir una buena correspondencia basándose en los términos de que el amonio induce tanto al polipéptido GSr así como un incremento en los niveles de los transcritos correspondientes a los genes GS1c y GS1d.

Para tratar de elucidar si los genes GS1c y GS1d realmente codifican para la isoforma GSr, se expresaron los genes de las isoformas en un vector de expresión en *E. coli*, para

posteriormente realizar ensayos tipo western y comparar los pesos de las diferentes isoformas de GS recombinantes con proteínas extraídas de raíces inducidas con amonio por 9 horas. En los resultados se observa que los polipéptidos correspondientes a los genes GS1a y GS1b tienen una misma movilidad que el polipéptido denominado GS1 y que los polipéptidos correspondientes a GS1c y GS1d tienen una misma movilidad que el denominado GSr. Por lo tanto, se puede concluir que para la isoforma GS1 los genes involucrados son GS1a y GS1b y para la isoforma GSr los genes involucrados son GS1c y GS1d (Sakakibara *et al.*, 1996).

El cambio en el perfil de las isoenzimas también es evidente en pruebas de separación como la cromatografía, en el que en raíces sin tratamiento se observan dos picos denominados I y II que están compuestos principalmente por los productos génicos de GS1a (pico I) y GS1d (pico II). Al realizar la inducción con amonio el patrón en el perfil de los picos se modifica y ahora predomina sólo el pico I integrado en su mayoría por producto de GS1d. Las propiedades cinéticas también son diferentes y se pueden observar en la tabla 2 (página 36) (Sakakibara *et al.*, 1996). Se encontraron diferencias entre los polipéptidos de las isoformas de GS en cuanto a su estabilidad frente a diferentes temperaturas; la GS1d fue más lábil, ya que fue estable sólo a temperaturas comprendidas entre 30 y 39° C; a una temperatura de 42° C perdió casi el 80% de su actividad y por arriba de ese límite no se detectó actividad después de 30 minutos de iniciada la evaluación. Por el contrario, GS1a fue estable inclusive hasta una temperatura de 48° C (Sakakibara *et al.*, 1996).

La estabilidad de las dos isoenzimas evaluadas (GS1a y GS1d) dependió también de sus requerimientos de iones catiónicos. Se observó que con magnesio a una concentración de 2 mM o manganeso a una concentración de 1 mM las isoformas GS1a y GS1d retenían el 90 y 80% de su actividad original respectivamente. Sin embargo, al quelar a los iones metálicos con 5mM de EDTA se pierde rápidamente la actividad de la GS1d e inclusive fue más pronunciado a un pH de 8.2 o al utilizar concentraciones muy pequeñas de EDTA como 0.5 mM. Se analizó también la posible causa de la disminución y se estableció que con concentraciones pobres de iones metálicos GS1d se disocia en monómeros de un peso de aproximadamente 40,000 Daltones por lo que las diferencias entre las actividades de GS1a y GS1d se podrían explicar por su fácil disociación de octámeros a monómeros. Es claro que existen diferencias entre las dos isoformas en términos de la estabilidad de su respectiva estructura cuaternaria (Sakakibara *et al.*, 1996).

Parece ser que la isoforma de GS de raíz (GSr) es más lábil e inclusive más inestable en el mantenimiento de su estructura cuaternaria lo que podría ser un factor fisiológicamente significativo, ya que esta baja estabilidad podría reflejar un recambio rápido de la enzima *in vivo* el cual podría ser importante para la asimilación principal del amonio externo por las raíces (Sakakibara *et al.*, 1996).

La respuesta de la glutamino sintetasa de maíz ante el amonio fue revisada también por el grupo del Dr. Snustad quien en su artículo publicado en 1994 (Sukanya *et al.*, 1994) establece que la expresión en la respuesta de los diferentes genes de la GS es órgano específica.

En raíces el gen GS11 incrementa su transcripción con NH_4Cl 10 mM y el gen GS12 disminuye su transcripción con la misma concentración de amonio. En brotes, la transcripción de GS11 cambia muy poco, pero se incrementa la transcripción de GS12 con el tratamiento de amonio (Sukanya *et al.*, 1994). La diferencia en la cantidad de los transcritos en respuesta al amonio fue de casi el doble respecto del control para el gen GS12 en los brotes y tres veces más abundante el transcrito del gen GS11 de raíces de plántulas de maíz. Estos máximos se alcanzaron 8 horas después de haber iniciado los tratamientos. La expresión diferencial observada entre los diferentes genes de la glutamino sintetasa se puede deber a la existencia de regiones reguladoras en los seis genes de GS y que deben contener elementos que actúan en *cis*, los cuales mediarían ya sea su expresión tejida específica o su respuesta órgano-específica a las diferentes fuentes de nitrógeno (Sukanya *et al.*, 1994).

El estudio del metabolismo del nitrógeno en el maíz incluye aspectos relacionados con la proporción que guarda entre los diferentes órganos de la planta, así como la movilización del mismo desde los órganos que lo contienen en gran cantidad hacia las partes que lo necesitan durante una etapa específica del desarrollo como puede ser la formación de la mazorca. En este caso, el investigador Ta (1991) analiza que la partición del nitrógeno en el maíz ha mostrado que el tallo contiene alrededor del 40% del nitrógeno total en el momento de la antesis. Después de la antesis cantidades substanciales de nitrógeno son translocadas de los órganos vegetativos hacia la mazorca; algunos investigadores indican que las hojas pueden llegar a contribuir hasta con el 65 al 85% del nitrógeno removilizado hacia el grano. En el proceso de removilización del nitrógeno, las proteínas son hidrolizadas y sus aminoácidos son convertidos en formas que pueden ser translocadas hacia los órganos en desarrollo. En muchas plantas superiores, incluyendo el maíz, la glutamina es la principal forma en la cual el nitrógeno es removilizado (Ta, 1991).

En el apartado sobre las características generales de la glutamina sintetasa se esbozó lo dinámico que pueden llegar a ser las proporciones de las diferentes isoformas de GS en las plantas durante su desarrollo, por lo que un vistazo rápido en el que se determine la proporción entre las isoformas GS1 y GS2 no indicará que esta misma proporción se conservará a lo largo del desarrollo. Lo anterior queda demostrado por Ta quien evaluó la proporción de la relación GS1:GS2 durante el desarrollo de las mazorcas de maíz y estableció que a lo largo del desarrollo posterior al evento de la antesis, en el tallo cambia la proporción en la relación GS1:GS2, que puede ir de 6:1 (tres semanas antes del evento) hasta 24:1 (6 semanas posteriores) (Ta, 1991).

La incorporación del nitrógeno sólo se realizó cuando fue aportado por el amonio y no por el nitrato; ésto se pudo discernir cuando se utilizaron ambos compuestos integrados por ^{15}N . El nitrógeno del amonio fue incorporado principalmente en el grupo amido de la glutamina, en el glutamato y en otros aminoácidos en menor grado. Se encontró también que se presentó en un menor grado en el grupo amino de la glutamina. Utilizando metionina sulfoxamina (MSX) un agente inhibidor de la actividad de GS, se evitó la conversión del amonio en glutamina, como se podría esperar (Ta, 1991). El amonio producido por la enzima nitrato reductasa (NR) parece ser la fuente principal del sustrato para la actividad de la GS en el maíz, recordando que es una planta C4 y casi no presenta fotorrespiración. En este estado del desarrollo, la GS de tallo estaría involucrada en la removilización de las

reservas de nitrógeno por lo que el tallo no solo es un órgano de soporte para las hojas sino que también puede ser un reservorio para el almacenamiento temporal de compuestos nitrogenados que pueden ser removidos para el desarrollo de la mazorca. Al mismo tiempo, GS esta involucrada en los tallos de maíz en la reasimilación del nitrógeno liberado de la degradación de las proteínas y en el recambio de aminoácidos producto de la removilización durante el periodo del llenado del grano de maíz (Ta, 1991).

Glutamino sintetasa y su expresión tisular

Aspectos de GS en el desarrollo de maíz

Esta última parte analiza el comportamiento de GS durante el desarrollo de la plántula de maíz.

Durante el desarrollo del grano de maíz, el pedúnculo, que es tejido basal maternal de la semilla, actúa como un conducto para transferencia del nitrógeno y los compuestos carbonados de las partes vegetativas de la planta a la semilla. La forma en la cual el nitrógeno es transportado hacia la semilla en desarrollo es especie específico y los resultados de los estudios del análisis de las pozas de aminoácidos así como de los estudios con precursores marcados sugieren que en el maíz el nitrógeno es transportado principalmente como aspartato, serina, glutamato y glutamina, los cuales comprenden alrededor del 80% de la poza de aminoácidos libres (Muhitch, 1988). Glutamina fue el aminoácido principalmente liberado de los tejidos del pedúnculo del grano de maíz, y los estudios del contenido de aminoácidos y del metabolismo sugieren que el pedúnculo es el principal sitio de síntesis de la glutamina del grano de maíz (Rastogi *et al.*, 1998).

El sistema vascular termina en el tejido del pedúnculo de la mazorca, y asimila subsecuentemente el paso a través de la región denominada pedúnculo placentario calazal (PPC) antes de alcanzar el endospermo de la semilla en formación (Muhitch, 1988). Se ha establecido que el máximo de la actividad encontrada para GS en la región PPC tiene un papel importante en la asimilación del nitrógeno en la mazorca, además de que su actividad se incrementa con el desarrollo que coincide a su vez con la máxima acumulación de nitrógeno (Rastogi *et al.*, 1998).

Por otra parte, al evaluar los valores de la actividad de la GS del embrión en formación, se observó que estos aumentan conforme transcurren los días posteriores a la antesis. Resultados similares fueron reportados también por Hadži-Taškovic (1986), por lo que su papel podría ser el de participar en la reasimilación del amonio liberado como resultado de las interconversiones de los aminoácidos que tienen lugar en el endospermo (Muhitch, 1988)

De la misma manera como se ha encontrado una variante que parece expresarse sólo en raíz, Muhitch (1989) reporta que existen dos variantes que se expresan sólo en el pedúnculo y a las que denomina GSp1 y GSp2 (Muhitch, 1989). Al separar a estas

isoformas mediante una electroforesis se observó que presentaban pesos diferentes los cuales son de 38,900 para GSp1 y 40,500 para GSp2 (Muhitch, 1989). La actividad total de la GS del pedúnculo se incrementa entre los 10 y 30 días posteriores a la antesis (DPA) durante el desarrollo de las mazorcas, lo cual coincide con el periodo de acumulación rápida de nitrógeno de la mazorca. Después de los 30 días posteriores a la antesis la actividad de la GS del pedúnculo decrece dramáticamente al mismo tiempo que la mazorca alcanza la madurez (Muhitch, 1989). La comparación de los perfiles obtenidos mediante cromatografía de intercambio iónico a varios tiempos del desarrollo de la mazorca, sugiere que el incremento de la actividad total de la GS observada de los 10 a los 30 DPA parece ser dada solamente por el incremento en la actividad de la isoforma GSp1 (Muhitch, 1989).

Los resultados obtenidos mediante la cromatografía de intercambio iónico así como el perfil de elución y las propiedades cinéticas inusuales respecto del glutamato sugieren que GSp1 es una isoforma única mazorca-específica de GS de maíz. Los autores especulan que una situación análoga se presenta para una isoforma específica de nódulos radiculares en *Phaseolus vulgaris* (Muhitch, 1989). Las dos isoenzimas del pedúnculo requieren de Mg^{2+} libre para actuar, algo similar a lo que se presenta para la GS de *E. coli*, en la que parece ser que coordina el grupo γ -carboxilo del glutamato y el grupo γ -fosfato del ATP en el sitio activo. Los requerimientos de magnesio libre para las glutamino sintetasas vegetales explican la cinética de saturación sigmoideal que ha sido descrita para algunas de las actividades de las GS en plantas superiores (Muhitch, 1989). Como GSp1 parece ser una isoforma única se elaboraron anticuerpos monoclonales contra GSp1 los cuales solo reconocieron a su blanco en el pedúnculo y en el grano de maíz (Rastogi *et al.*, 1998). Si la isoforma GSp1 parece ser una forma pedúnculo específica de las GS de maíz, uno de los objetivos del grupo era el aislar el ADNc correspondiente a esta isoforma así como diseñar un análisis de su expresión en varios tejidos de la planta de maíz. Una posibilidad es que el gen que lo codifica sea alguno de los de la familia de GS ya reportados por los grupos de trabajo de Snustad y Sugiyama (Rastogi *et al.*, 1998). Al hacer un análisis de tipo Northern blot utilizando sondas 3'gen específicas o secuencias no codificables divergentes, se observan niveles altos de expresión de los genes de todas las glutamino sintetasas citosólicas en raíces y pedúnculos, no así en las hojas en los que se sabe que el principal gen que se expresa es el GS2 (Rastogi *et al.*, 1998).

La expresión de los diferentes genes evaluados muestra diferencias entre ellos, por ejemplo GS11 y GS15 parecen expresarse solo en raíz. GS13 y GS14 se expresan en todos los tejidos evaluados (hoja, raíz, pedúnculo, embrión y endospermo); GS12 presenta un patrón de expresión sólo en pedúnculo. GS13 se expresa también en el mismo órgano. Los datos que han recabado Muhitch y sus colaboradores les hacen pensar que los genes GS12 y GS13 podrían estar codificando para sus variantes GSp1 y GSp2 respectivamente (Rastogi *et al.*, 1998).

Al realizar un análisis comparativo de la expresión de los genes de GS éstos parecen ser similares a los reportados por el grupo de Snustad (Li, 1993; Sukanya *et al.*, 1994). Estos investigadores reportan un comportamiento parecido entre GS12, GS11 y GS15, en el que el primero se acumula principalmente en las raíces. Sin embargo Sakakibara y colaboradores (1996), encontraron que la expresión de GS12 se presentó en niveles muy

bajos o inclusive indetectables. Es interesante acotar que este autor parece encontrar una concordancia entre la nomenclatura de los dos grupos que han logrado aislar los ADNc para las diferentes GS (Rastogi *et al.*, 1998). La expresión de los diferentes genes GS1 durante diferentes estados del desarrollo del pedúnculo, muestra también diferencias. Los genes GS11, GS14 y GS15 no presentaron una señal y ni siquiera un incremento, sólo GS12 y GS13 muestran respuesta y para el caso de GS12 ésta se ve incrementada con el transcurso del tiempo, a diferencia de GS13 que se mantiene constante a lo largo del tiempo (Rastogi *et al.*, 1998). Los datos obtenidos les permiten a Rastogi y colaboradores indicar que el gen GS12 de glutamino sintetasa codifica para la única isoforma de GS específica de pedúnculo denominada GSp1 y que su expresión, además, es regulada durante el desarrollo (Rastogi *et al.*, 1998).

II Hipótesis

Es posible que el estrés por sal durante los primeros quince días de crecimiento afecte la actividad de la enzima glutamino sintetasa de plántulas de maíz.

III Objetivo General

Evaluar si concentraciones crecientes de NaCl durante los primeros quince días de crecimiento tienen un efecto significativo sobre la actividad de glutamino sintetasa, una enzima clave en el metabolismo nitrogenado, en dos variedades de plántulas de maíz.

IV Objetivos particulares

Evaluar el efecto que tienen concentraciones crecientes de cloruro de sodio sobre el crecimiento de dos variedades de plántulas de maíz.

Determinar la concentración de la poza de glutamato y glutamina en plántulas de maíz sometidas a concentraciones crecientes de NaCl.

Cuantificar la actividad específica de la enzima glutamino sintetasa de tejido foliar y radicular de plántulas de maíz de sometidas a concentraciones crecientes de NaCl.

Evaluación inicial de la expresión del gen *gln* 1-4 de plántulas de maíz sometidas a concentraciones crecientes de NaCl.

V Material y métodos

Material biológico:

Se utilizó maíz (*Zea mays* L.) de la raza chalqueño variedad Cajete y variedad Pinto Salvatore, los cuales fueron donadas por el Dr. Nestor Espinosa, INIFAP.

Características	Pinto Salvatore	Cajete
Orígen	Estado de Puebla	Yanhuitlán, Oaxaca
Colector	Nestor Espinosa	Nestor Espinosa
Ciclo vegetativo	135 – 145 días	145 – 160 días
Altura	2 a 2.2 m	3.5 a 3.9 m
Altura mazorca	1.35 a 1.45 m	1.75 a 1.95 m
Color del tallo	Morado	Morado
Días a floración	75	135
Área de adaptación	Valles del Tenso (Puebla) 2,100 msnm	Mixteca Alta (Oaxaca) 2,250 msnm
Rendimiento	4 ton/ha	3.5 ton/ha
Resistencia a sequía	*	**
Grano	Azul con blanco	Blanco
Época de crecimiento	junio	marzo a abril
Requerimiento hídrico	Temporal	Humedad residual
Soporte de época seca	Intraestival	Intraestival e invernal

Tabla 3. Características de las variedades de maíz utilizadas (Comunicación personal, Dr. Nestor Espinosa, INIFAP).

Se germinaron semillas para el desarrollo de plántulas. Primero se les dió un tratamiento con una solución fungicida de Captan (N-(Triclorometiltio) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida) (100 mg/ 250 ml) a la que se agregaron cuatro gotas de detergente Tween 20 (Sigma, No. Catalogo P1379) durante 20 minutos. Posteriormente se enjuagaron con abundante agua esterilizada. Se colocaron dos semillas en un vaso de unicel con capacidad de 350 ml y se utilizó agrolita como soporte inerte.

Las semillas fueron regadas cada 4 días con 100 ml de medio mineral de Hoagland (Jones, 1982), adicionado con NaCl y cuyas concentraciones finales fueron: 85 mM, 121 mM y 170 mM.

El tiempo de crecimiento de la plántula en el que se tomaron las muestras de 0.2 g de tejido foliar y radicular fue de 10, 15 y 20 días. Se pesó el tejido, el cual se congeló a -70 °C para su posterior utilización en la extracción enzimática.

Composición de la solución mineral de Hoagland.

<u>Macronutrientes</u>		250 ml	Alícuota	mg/ml

Ca(NO ₃) ₂	1M	41.025g	5 ml	1181.0
KNO ₃	1M	25.27 g	5 ml	50.60
MgSO ₄ · 7 H ₂ O		30.09 g	2 ml	492.0
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	6.81 g	1.702 g	1 ml	
EDTA	9.114 g	2.27 g		
KH ₂ PO ₄	1M	34.022g	1 ml	136.0
Solución de micronutrientes			1 ml	

<u>Micronutrientes</u>	250 ml
H ₃ BO ₃	0.715 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0.4525 g
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0.055 g
Na ₂ MoO ₄ · 4 H ₂ O	0.005 g
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.02 g

NOTA: se disuelve por separado el sulfato de fierro y el EDTA en un volumen inferior al deseado, se calienta ligeramente el EDTA y se incorpora al sulfato férrico para aforar posteriormente. La proporción es: 6.81g FeSO₄·7 H₂O : 9.1 g de EDTA

Extracción de proteínas para cuantificar la actividad de glutamino sintetasa de maíz.

Se utilizó la raíz y hoja de las dos variedades de maíz, las cuales se maceraron en un mortero a 4 °C adicionando una proporción de 1:10 (p/v) de una solución amortiguadora de extracción de acuerdo a Lea (1990), la cual contiene :

	Solución Stock	volumen utilizado	Concentración final
Trizma-base pH 7.8	0.5 M	8,780 µl	50 mM
ácido etilendiamintetraacetato (EDTA)	0.5 M	20 µl	1 mM
ditrioteitol (DTT)	10 mM	1,000 µl	1 mM
MgSO ₄	1 M	100 µl	10 mM
glutamato de Sodio	5 mM	100 µl	500mM
volumen total		10,000 µl	

Se centrifugó durante 30 minutos a 14,000 g's y el sobrenadante de la centrifugación (extracto crudo) se utilizó para la determinación enzimática de la glutamino sintetasa.

Determinación de la actividad de la glutamino sintetasa de maíz.

En la reacción de síntesis catalizada por la enzima glutamino sintetasa, la incorporación de una molécula de amonio al glutamato produce una molécula de glutamina. Sin embargo, la sustitución de hidroxilamina como sustrato en lugar del amonio da como producto γ -glutamihidroxamato (ggh), el cual es un compuesto que se puede cuantificar mediante el uso del espectrofotómetro. Se realizó una modificación del método original de Kanamori y Matsumoto (1972) para obtener un volumen final de 100 µl; las proporciones y concentraciones utilizadas fueron:

	Solución Stock	Volumen utilizado	Molaridad final
Trizma-base pH 7.5	0.2 M	16.6 µl	33.2 mM
MgSO ₄	1.0 M	3.3 µl	33 mM
NH ₂ OH	0.1 M	10.0 µl	10 mM
adenosin trifosfato (ATP)	0.05 M	6.6 µl	3.3 mM
cisteína	0.1 M	3.3 µl	3.3 mM

volumen de la mezcla de reacción		39.8 µl	
extracto con la enzima		43.6 µl	

volumen parcial		83.4 µl	
glutamato de Sodio	0.5 M	16.6 µl	83 mM

volumen total		100.0 µl	

La reacción se realizó en tubos Eppendorf con capacidad máxima de 750 µl y la reacción comenzó con la adición del glutamato para totalizar un volumen final de 100 µl. Los tubos se mezclaron con ayuda de un vortex. El blanco contenía todos los componentes y, en su caso, la reacción se detuvo inmediatamente agregando una solución de cloruro férrico para considerarla como el tiempo cero. La mezcla de reacción se incubó a 37° C durante 30 minutos en un Heat-Block.

La formación de γ -glutamihidroxamato fue determinado por la adición de 30 µl de una solución de cloruro férrico según O'Neal y Joy (1973).

	Solución Stock	volumen utilizado
FeCl ₃ (disuelto en HCl 0.2 N)	0.36 M	10.0 µl
HCl	0.67 M	10.0 µl
ácido tricloroacético (TCA)	0.20 M	10.0 µl

Esta solución detuvo la reacción y permitió determinar colorimétricamente el producto formado. Los tubos fueron mezclados vigorosamente en un Vortex. Para eliminar las sales precipitadas se centrifugaron durante 1 minuto en una microcentrifuga. Se tomaron 70 µl de esta mezcla y se colocaron en una cubeta de cuarzo para espectrofotómetro con capacidad mínima de 50 µl. Se midió la diferencia de absorbancia respecto a cada blanco a 540 nm en un espectrofotómetro. La concentración de γ -glutamihidroamato formado fue determinada extrapolando los valores de absorbancia en una curva patrón, realizada usando γ -glutamihidroamato comercial (Sigma) en la presencia de todos los componentes excepto ATP.

Curva patrón de γ -glutamihidroamato

A la mezcla de reacción no se le agregó ATP. La concentración de γ -glutamihidroamato (ggh) fue de 2 mg/ml

	Blanco	10	20	30	40	50 (min)
Solución						
Mezcla de reacción (µl)	56.4	56.4	56.4	56.4	56.4	56.4
γ -glutamihidroamato (µl)	----	5	10	15	20	25
Solución de Extracción (µl)	43.6	38.6	33.6	28.6	23.6	18.6
Volumen total (µl)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Los pasos son similares a los de la lectura de la actividad de la enzima GS

Determinación de la cantidad de proteína total de los extractos.

La cuantificación proteínica se realizó utilizando el reactivo de Bradford y se empleó albumina sérica bovina para realizar una curva patrón.

Cuantificación de prolina

La cuantificación de prolina se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Bates *et al.*, 1973.

- 1.- La muestra del tejido se conservó a - 70 °C y se homogenizó en mortero con ácido sulfosalicílico al 3%. La proporción fue 0.5 g de tejido en 10 ml (0.125g / ml).
- 2.- El homogenizado se centrifugó durante siete minutos a 3,500 r.p.m. en una centrifuga clínica.
- 3.- Se tomó 1 ml de la muestra y se colocó en tubo de ensaye de 15 x 150 mm.

- 4.- Al mismo tiempo se preparó el tubo que se utiliza como blanco con 1 ml de ácido sulfosalicílico al 3%.
- 5.- A cada tubo se le agregaron 1 ml de ácido acético glacial y 1 ml de ninidrina ácida. Los tubos se agitaron con suavidad, se taparon con canicas y se incubaron durante una hora en un baño con agua a temperatura de ebullición.
- 6.- La reacción se detuvo al pasar los tubos a un recipiente con hielo.
- 7.- Las muestras se dejaron a temperatura ambiente y se extrajo la mezcla agregando 2 ml de tolueno, se agitaron en un Vortex durante 15 segundos.
- 8.- El tolueno con el cloroformo se aspiró con una pipeta Pasteur.
- 9.- Las muestras se colocaron en cubetas de cuarzo y se leyó su absorbencia a 520 nm en un espectrofotómetro.

Determinación de la poza de glutamato y glutamina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Con el objeto de comprobar si la poza de aminoácidos glutamato y glutamina involucrados en el metabolismo del nitrógeno se mantiene constante o presenta algún cambio significativo, se determinaron los aminoácidos presentes en las muestras mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El método de extracción se realizó a partir de una modificación al método reportado por Shaul y Galili, 1992.

- 1.- A 20 mg de tejido vegetal se le agregaron 1,200 µl de la solución de extracción la cual contenía: H₂O/cloroformo/metanol en una proporción: 3:5:12 [180 µl, 300 µl y 720 µl respectivamente]
- 2.- Después de macerar el tejido en un mortero, la solución se pasó a tubos Eppendorf y se centrifugó a 10 000 g's en una microfuga durante 3 minutos. El sobrenadante se guardó.
- 3.- La pastilla se enjuagó con 1200 µl de la solución de extracción [180/300/720]
- 4.- Se centrifugó nuevamente como en el paso 2.
- 5.- Los dos sobrenadantes se mezclaron hasta obtener un volumen final de 2,400 µl.
- 6.- Se agregaron 600 µl de cloroformo y 900 µl de H₂O.
- 7.- Se centrifugó igual que en el paso 2.
- 8.- La fase superior de agua-metanol se separó.
- 9.- Se secó al vacío.
- 10.- La pastilla se disolvió en 200 µl de H₂O (Sin control interno)

La determinación de aminoácidos se realizó en colaboración con el Laboratorio de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Extracción de ARN total

El método utilizado empleó el reactivo comercial Trizol (Invitrogen) y de acuerdo al

protocolo sugerido por la misma casa comercial fue el siguiente.

- 1.- La proporción de Trizol tejido fresco fue de 1ml/0.2 g
- 2.- Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Se agregaron 200 µl de una solución cloroformo alcohol isoamílico en proporción 24:1.
- 4.- Se agitó e incubó durante 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Se centrifugó a 12 000 g's durante 15 minutos a 4o C en una microcentrifuga. El ARN se localiza en la fase acuosa
- 6.- La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 500 µl de isopropanol, el cual se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 7.- Se centrifugó a 12 000 g's y 4° C durante 10 minutos.
- 8.- A la pastilla se le agregó 1 ml de etanol al 75% y se agitó en un Vortex.
- 9.- Se centrifugó a 7 500 g's y 4° C durante 5 minutos.
- 5.- La pastilla se secó al vacío.
- 6.- El ARN se disolvió en H₂O (libre de ARNasas) o en una solución SDS al 0.5 %

Precipitación de ARN

ARN	12 µl
H ₂ O	38 µl
Acetato de Na	5 µl
Alcohol absoluto	125 µl
Volumen Total	180 µl

Se incubó a -70° C durante 30 minutos

Se centrifugó a 12000 rpm a 4° C durante diez minutos.

Se decantó y lavó con 100 µl de etanol al 70 %, para posteriormente centrifugar a 12000 rpm a 4° C durante 1° minutos. Se resuspendió el ARN.

Northern blotting (Amersham)

Se incubó el ARN a 65° C durante 5 minutos en la siguiente solución:

ARN	volumen final	6 µl
Formamida (deionizada)		12.5 µl
Buffer MOPS 10X		2.5 µl
Formaldehido (37 %)		4.0 µl

Posteriormente se enfrió en hielo y se agregaron 2.5 µl de glicerol al 50 % conteniendo 0.1 mg/ml de azul de bromofenol.

Elaboración del gel de agarosa al 1 al 1.5 % utilizando buffer MOPS

Agarosa	1 a 1.5 g
Buffer MOPS 10X	10 ml
H ₂ O	73 ml

Se disolvió la agarosa y se dejó enfriar a 50° C, se verificó el volumen de 83 ml. Se agregó 17 ml de formaldehído (37 % v/v). Se mezcló y vació inmediatamente. La electroforesis se llevó a cabo en Buffer MOPS 1X.

Transferencia del ARN a filtro de nylon

La transferencia del ARN a un soporte sólido, en este caso una membrana de nylon, se realizó por capilaridad por un periodo de 12 horas. Al término del tiempo se secó la membrana y se fijó el ARN con un pulso de luz ultravioleta por espacio de dos minutos.

Sondas utilizadas

Las sondas de glutamino sintetasa de maíz fueron amablemente donadas por el Dr. Peter Snustad de la Universidad de Minesota (Li *et al.*, 1993), las cuales fueron: GS₁₋₄, GS₁₋₅ y GS₂. De éstas sólo se amplificó y utilizó la GS₁₋₄. (Li *et al.*, 1993).

La sonda se encontraba insertada en el plásmido pUC119 de 3.2 Kb.

La extracción de la sonda se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Sambrook *et al.* (1989).

Para liberar al inserto se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI y Hind III.

Sonda de α tubulina de maíz.

Se obtuvo también una sonda de α tubulina proporcionada por el Dr. Javier Plascencia (Facultad de Química, UNAM). El inserto de 1900 pb se encontraba en el plásmido pZL1 y para liberar el inserto se realizó una restricción con las enzimas XbaI y SalI.

Preparación de la sonda (volumen final de 20 µl)

ADN GS ₁₋₄ concentración de 275 ng/µl	1 µl
Buffer de extensión	4 µl
dNTP	4 µl
H ₂ O	7 µl
dCTP	3 µl
Fragmento Klenow	1 µl
Total	20 µl

Se incubó una hora a 37° C

Se prehibridó con una solución de hibridación que contenía

Buffer de fosfatos	0.25 M pH 7.2
Albumina sérica bovina	1 % p/v
SDS	7 % p/v

Se colocaron 6 ml de esta solución amortiguadora en cada tubo de un horno de hibridación, el cual contenía 2 filtros cada uno.

La temperatura del horno se colocó a 58° C y se mantuvieron durante 2 horas.

La sonda se calentó durante 5 minutos a 95° C para inactivar a la enzima Klenow y se transfirió luego a un baño con hielo. El volumen de la sonda se llevó a 200 ml agregando 180 ml de H₂O.

Se tomó un 1 ml de la muestra para el conteo de radiactividad.

Limpieza de la sonda

Se elaboró una columna de Sephadex G 50 en una jeringa con capacidad de 1 ml, la cual se empacó colocando fibra de vidrio en la parte inferior y centrifugando sucesivamente a 3000 rpm durante 3 minutos.

La sonda se paso por la columna y se midió su actividad en cpm.

Se agregó la sonda a los filtros

Se realizó la hibridación durante un periodo de 20 a 21 horas y a una temperatura de 65° C

Se lavó el filtro durante media hora con una solución SSC 1X, SDS al 0.1 %

Se colocó la sonda en solución a punto de ebullición en solución SDS al 0.1 % durante 5 minutos y se monitoreó la actividad radiactiva.

Se secó el filtro de nylon entre dos papeles filtro.

En un cuarto oscuro, el soporte de nylon se colocó sobre una placa fotográfica velada de rayos X y encima se le colocó una placa fotográfica de rayos X nueva con una placa intensificadora, todo esto se colocó en una caja especial para el proceso. Se mantuvo a una temperatura de -70° C, durante un tiempo de por lo menos cuatro días.

Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba t de Student. La diferencia se consideró significativa cuando $p \leq \alpha$ a 0.01. El programa estadístico empleado fue Microcal Origin 7.0.

VI Resultados

Efecto del NaCl sobre el crecimiento de las plántulas de maíz.

Uno de los efectos que tiene el estrés por sal sobre los vegetales es el de disminuir su velocidad de crecimiento. Esto se observa en las figuras 4, 5 y 6, en las que es evidente que el control siempre presenta una mayor longitud respecto de los tratamientos evaluados. Existe una relación inversamente proporcional entre el incremento en la concentración de NaCl y la talla que presentan las plántulas de maíz. Inclusive para el día 20 de muestreo las plántulas expuestas a una concentración de 170 mM presentan un incremento en el crecimiento respecto del presentado al día 15 pero, aún así no logran alcanzar la dimensión de las plántulas control (Figura 5 y 6).

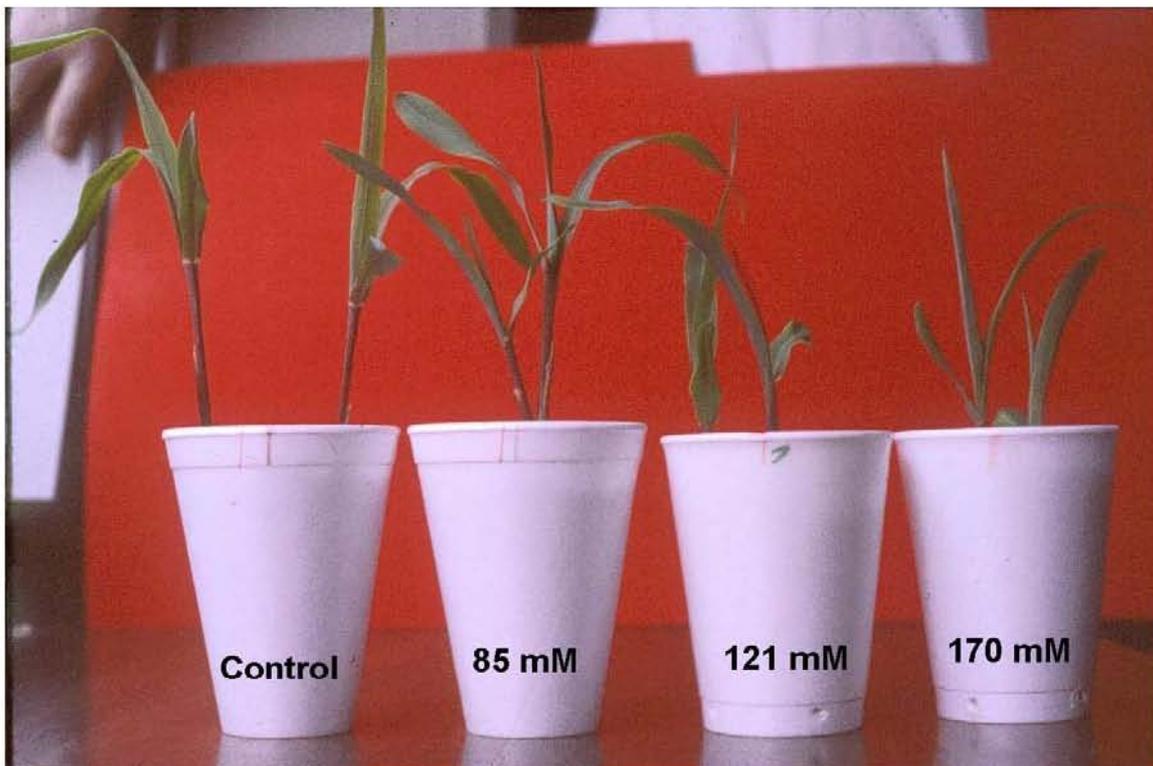


Figura 4. Efecto del estrés por sal sobre el crecimiento en plántulas de maíz. De izquierda a derecha: tratamiento control; tratamiento con 85 mM de NaCl; tratamiento con 121 mM de NaCl y tratamiento con 170 mM de NaCl. La variedad que se muestra es Cajete a los 10 días de crecimiento.

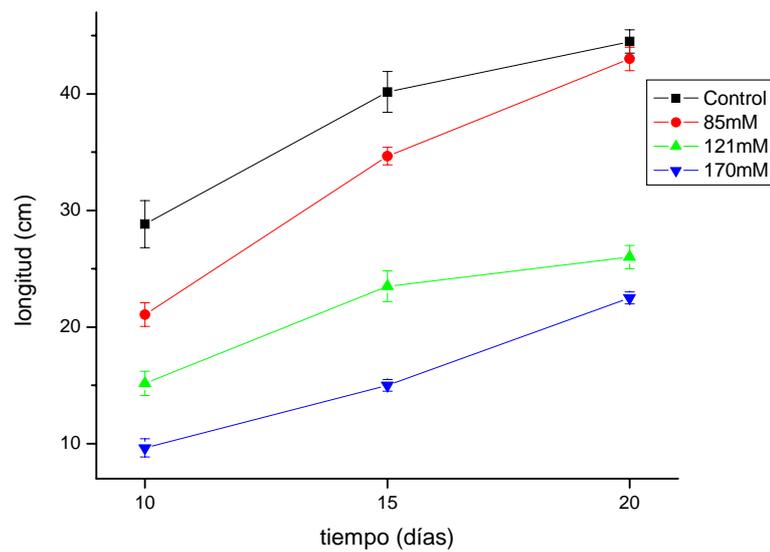


Figura 5. Longitud total de las plántulas de maíz de la variedad Pinto Salvatore. Las plántulas fueron medidas con una regla desde el ápice radicular hasta la parte apical de la planta. Cada punto representa el promedio de tres mediciones independientes.

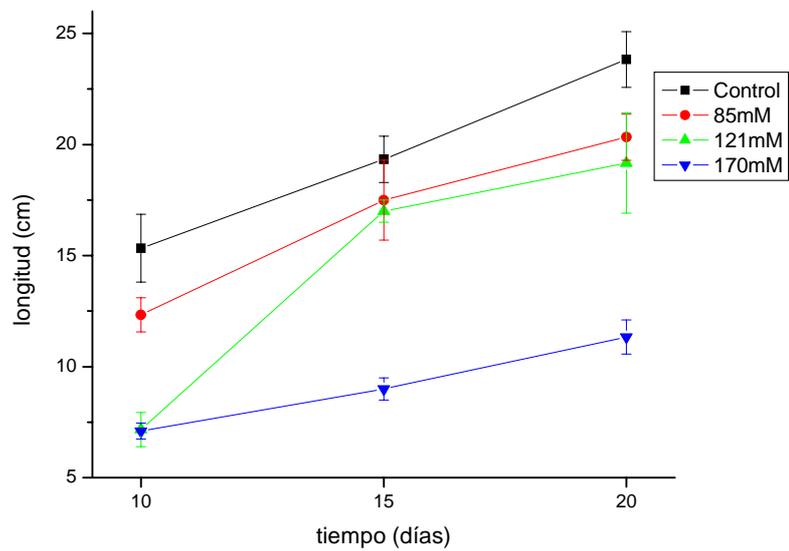


Figura 6. Longitud total de las plántulas de maíz de la variedad Cajete. Las mediciones se hicieron como se detalla en la figura 5.

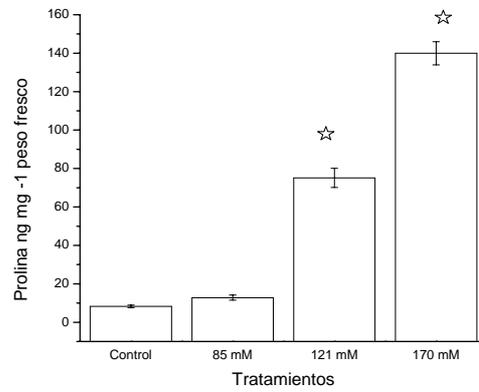
Concentración de prolina durante el estrés por sal.

Al cuantificar la concentración del aminoácido prolina, los resultados muestran que en todos los tratamientos la concentración para el control presenta valores por debajo de los 20 ng mg^{-1} de tejido fresco. En el día 10 de crecimiento de las plántulas, el comportamiento es muy similar tanto en las dos variedades como en los dos tejidos evaluados (hoja y raíz), se tiene una concentración mayor a 40 ng mg^{-1} peso fresco para el tratamiento de 121 mM y es posible observar también que la cantidad de prolina para las plántulas expuestas a una concentración de 170 mM presenta valores que se encuentran entre un intervalo de 100 a 140 ng mg^{-1} peso fresco (figuras 7 a 10).

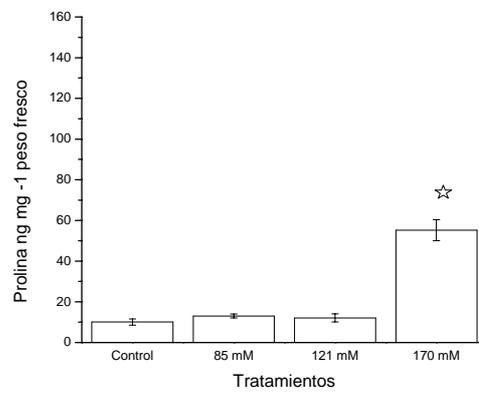
Para el día 15 de crecimiento de las plántulas, algunos de los valores disminuyen respecto de sus similares del día 10, como en el tejido foliar y radicular de la variedad Cajete (figura 9 B y 10 B), así como para el tejido foliar y radicular de la variedad Pinto Salvatore (figuras 7 B y 8 B).

En la variedad Pinto Salvatore tanto el tejido foliar como radicular en el día 20 de crecimiento presentan un comportamiento similar, ya que el máximo de concentración no alcanza valores de 40 ng mg^{-1} peso fresco inclusive para el tratamiento más salino que es de 170 mM (figuras 7 C y 8 C). Sin embargo, la variedad Cajete presenta un incremento considerable en la concentración de prolina en el tejido radicular a los 20 días del tratamiento y sobre todo para el tratamiento de 121 mM de NaCl el cual tiene un valor de 135 ng mg^{-1} peso fresco así como el tratamiento de 170 mM de NaCl que presenta una concentración de 110 ng mg^{-1} peso fresco (figura 10 C). El tejido foliar de esta variedad presenta sólo un máximo de concentración para el tratamiento de 170 mM de NaCl con un valor de 84 ng mg^{-1} peso fresco de prolina (figura 9 C).

A 10 días.



B 15 días.



C 20 días.

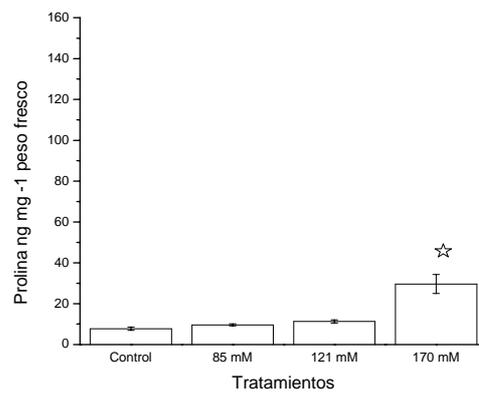
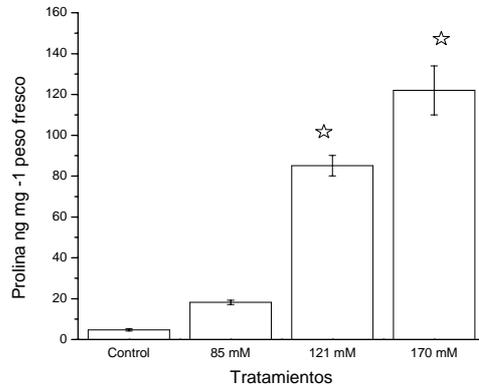
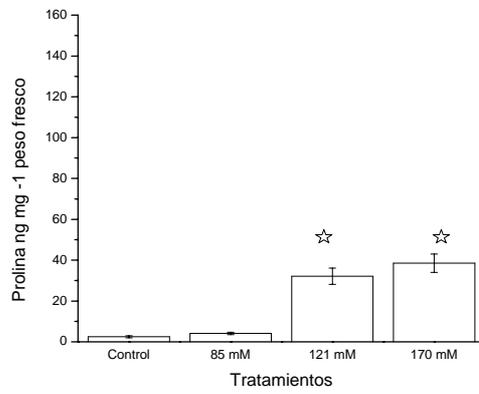


Figura 7. Cuantificación de prolina en tejido foliar de plántulas de maíz de la variedad Pinto Salvatore. Las gráficas A, B y C corresponden a los días de crecimiento 10, 15 y 20 respectivamente. El * indica una diferencia significativa entre los valores del tratamiento salino y de las plántulas control ($p \leq 0.01$).

A 10 días.



B 15 días.



C 20 días.

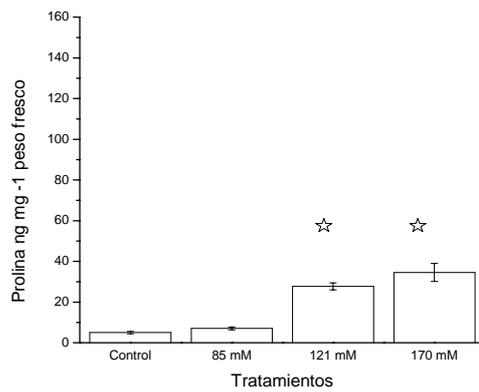
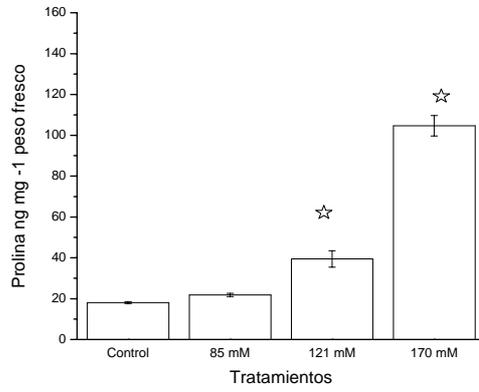
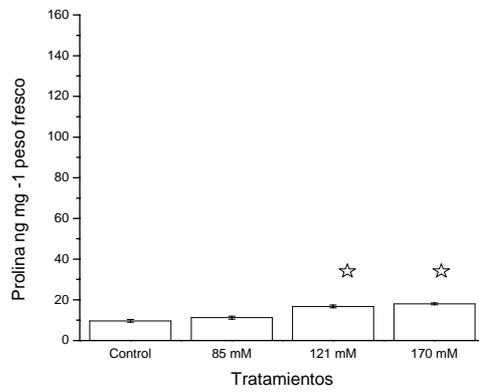


Figura 8. Cuantificación de prolina en tejido radicular de plántulas de maíz de la variedad Pinto Salvatore. Las gráficas A, B y C corresponden a los días de crecimiento 10, 15 y 20 respectivamente. El * indica una diferencia significativa entre los valores del tratamiento salino y de las plántulas control ($p \leq 0.01$).

A 10 días.



B 15 días.



C 20 días.

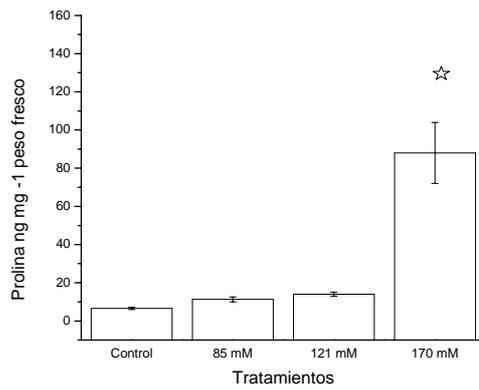
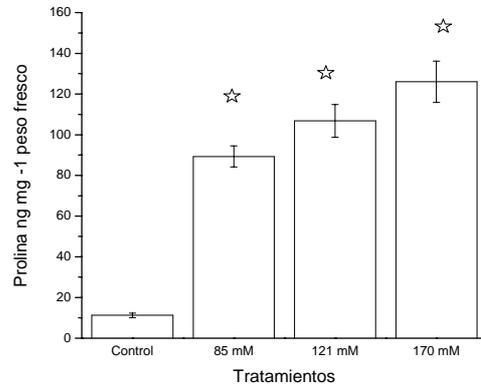
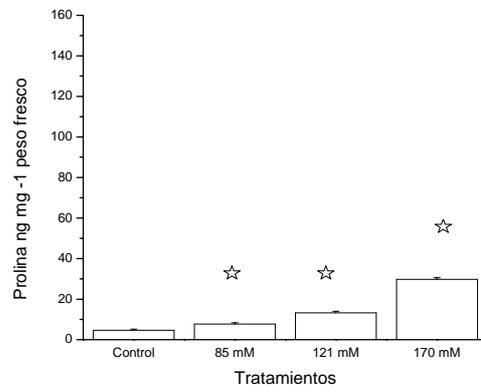


Figura 9. Cuantificación de prolina en tejido foliar de plántulas de maíz de la variedad Cajete. Las gráficas A, B y C corresponden a los días de crecimiento 10, 15 y 20 respectivamente. El * indica una diferencia significativa entre los valores del tratamiento salino y de las plántulas control ($p \leq 0.01$).

A 10 días.



B 15 días.



C 20 días.

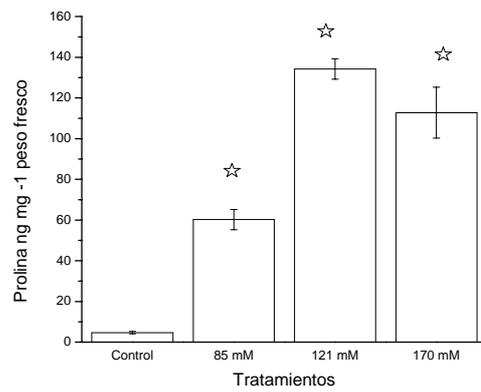


Figura 10. Cuantificación de prolina en tejido radicular de plántulas de maíz de la variedad Cajete. Las gráficas A, B y C corresponden a los días de crecimiento 10, 15 y 20 respectivamente. El * indica una diferencia significativa entre los valores del tratamiento salino y de las plántulas control ($p \leq 0.01$).

Cuantificación de la poza de glutamato y glutamina.

La cuantificación de las pozas de glutamato y glutamina se realizó a partir de una extracción del tejido fotosintético de plántulas de la variedad Cajete con 15 días de crecimiento, para posteriormente realizar un ensayo de cromatografía líquida de alta resolución. Los resultados de la tabla 4 muestran que la poza de glutamina se mantiene en valores muy similares para todos los tratamientos. Sin embargo, el comportamiento de la poza de glutámico tiende hacia un aumento conforme se incrementa la concentración de sal en los tratamientos. Esto es interesante ya que el glutamato es el precursor tanto de la prolina como de glutamina.

Tratamiento	glutámico	glutamina
Control	1600 ± 84.1	2600 ± 367
85 mM NaCl	2450 ± 94.7	2500 ± 879
121 mM NaCl	2650 ± 79.9	2700 ± 869
170 mM NaCl	4200 ± 11.3	3100 ± 102

Tabla 4. Valores de la poza de ácido glutámico y glutamina. La concentración se expresa como micromolar.

Actividad específica de glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2)

Actividad específica de glutamino sintetasa de tejido foliar de plántulas de maíz.

Un primer dato que es pertinente destacar es que los valores de actividad de glutamino sintetasa control se mantienen en un intervalo de entre 40 y 60 nanomoles de γ -glutamihidroxamato (ggh) formado por miligramo de proteína por minuto para las dos variedades y en los diferentes días de crecimiento (figuras 11 y 12).

El comportamiento de la actividad de glutamino sintetasa de tejido foliar de la variedad Pinto para el día 10 de crecimiento muestra un ligero aumento para el tratamiento con 85 mM de NaCl, el tratamiento con 121 mM de NaCl presenta una ligera disminución respecto del control y el tratamiento con 170 mM presenta valores similares al control (figura 11 A).

En el día 15 de crecimiento la tendencia es hacia un incremento en la actividad para los tratamientos con 85 y 121 mM de NaCl, para las plantas tratadas con 170 mM de NaCl se vuelve a presentar un patrón similar al control (figura 11 B).

La actividad registrada para el día 20 tiende a ser más uniforme entre el control y los tratamientos como puede observarse en la figura 11 C.

Para la variedad Cajete el comportamiento de la actividad de glutamino sintetasa varía respecto de la variedad Pinto. En el día 10 de crecimiento las plantas expuestas a una concentración de 85 mM de NaCl presentan una disminución en la actividad respecto del control (figura 13 A), lo que contrasta con la actividad registrada para esa misma concentración en la variedad Pinto (figura 11 A) en la que la actividad fue ligeramente mayor al control. Los tratamientos con 121 y 170 mM de NaCl presentan valores similares al control.

En el día 15 de crecimiento el tratamiento con 85 mM de NaCl tiende a tener mayor actividad respecto del control aunque se presenta una gran dispersión de los valores obtenidos (figura 13 B). La tendencia es hacia una disminución de la actividad registrada conforme se incrementan las concentraciones de sal (121 y 170 mM NaCl) (figura 13 B).

Para el día 20 de crecimiento el patrón de comportamiento sigue siendo similar al del día 15 ya que se registra un incremento en la actividad de la glutamino sintetasa de plantas expuestas a 85 mM de NaCl y una tendencia a disminuir dicha actividad conforme se incrementa la concentración de sal (121 y 170 mM de NaCl) (figura 13 C). El tratamiento con 170 mM de NaCl presenta valores similares al control.

Actividad específica de glutamino sintetasa en tejido radicular.

A diferencia del tejido foliar, en tejido radicular los valores para el control no se mantuvieron constantes en un intervalo pequeño ya que se registraron valores mínimos de 50 y máximo de 200 nanomoles de γ -glutamilhidroxamato formado por miligramo de proteína por minuto (figura 12 y 14).

En la variedad Pinto la actividad de glutamino sintetasa en el día 10 de crecimiento presenta una tendencia hacia la disminución de la actividad conforme se incrementa la concentración de NaCl (figura 12 A).

En el día 15 de crecimiento la actividad disminuye en el primer tratamiento con NaCl (85 mM) (figura 12 B) para luego presentar un valor mayor al control en la siguiente concentración de sal (121 mM) y posteriormente presenta nuevamente un valor menor al control en la siguiente concentración de sal (170 mM) (figura 12 B).

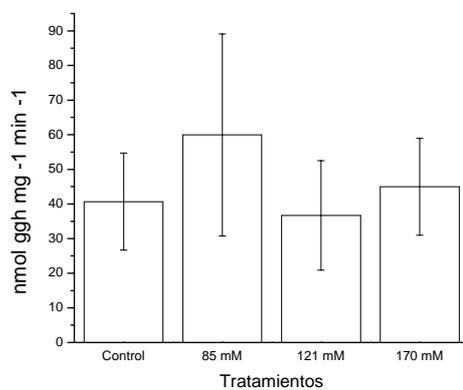
El día 20 de crecimiento presenta una disminución en la actividad de la glutamino sintetasa de plántulas con 85 mM de NaCl (figura 12 C) y una tendencia hacia el incremento en dicha actividad para finalizar con un valor similar al del control en las plántulas expuestas a una concentración de 170 mM de NaCl (figura 12 C).

Para la variedad Cajete la actividad registrada de la glutamino sintetasa en el día 10 de crecimiento muestra al igual que en la otra variedad una tendencia a disminuir la actividad de la enzima conforme se incrementa la concentración de NaCl (figura 14 A).

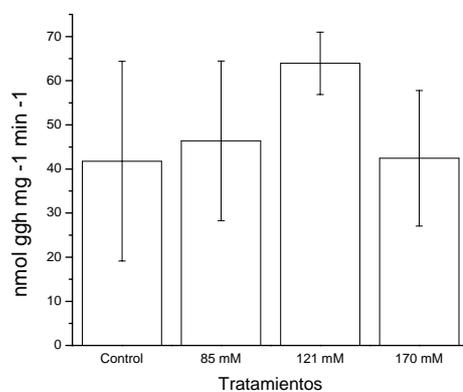
En el día 15 de crecimiento la tendencia anterior no se conserva y se observa un patrón diferente, la actividad tiende hacia un incremento en los primeros dos tratamientos (85 y 121 mM) (figura 14 B) para posteriormente presentar un valor más bajo que el control con el tratamiento con 170 mM de NaCl (figura 14 B).

En el día 20 de crecimiento sólo las plántulas expuestas a 85 mM de NaCl presentan un incremento en la actividad de la glutamino sintetasa de tejido radicular ya que la actividad registrada para los tratamientos con 121 y 170 mM de NaCl es similar al control (figura 14 C).

A 10 días.



B 15 días.



C 20 días.

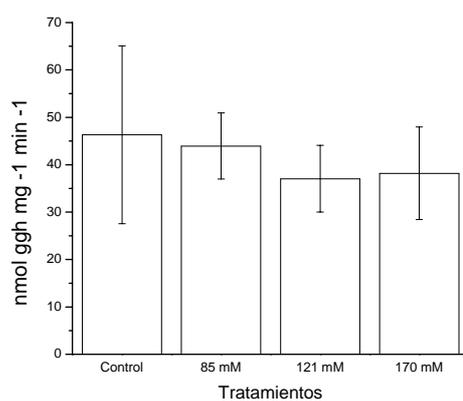
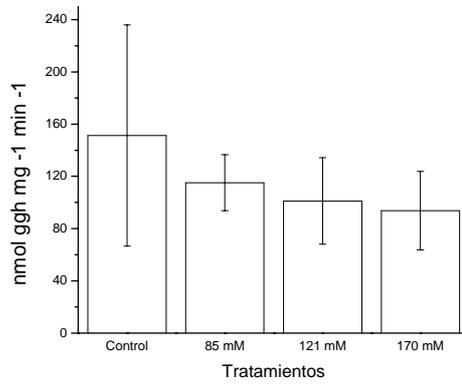
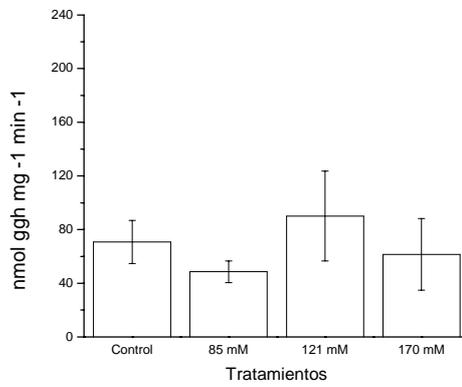


Figura 11. Actividad específica de glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2) de tejido foliar de plántulas de maíz de la variedad Pinto Salvatore. Las gráficas A, B y C corresponden a los ensayos efectuados con muestras de 10, 15 y 20 días de crecimiento respectivamente. La actividad específica de glutamino sintetasa se expresa como nanomoles de γ -glutamihidroxamato (ggh) formado por miligramo de proteína por minuto.

A 10 días.



B 15 días.



C 20 días.

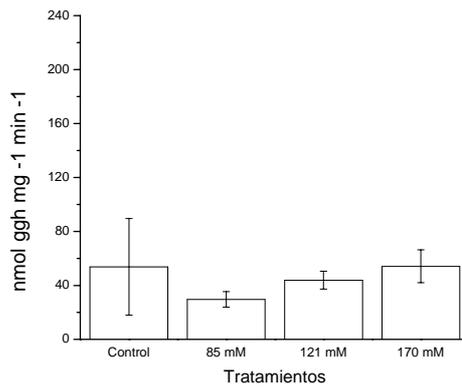
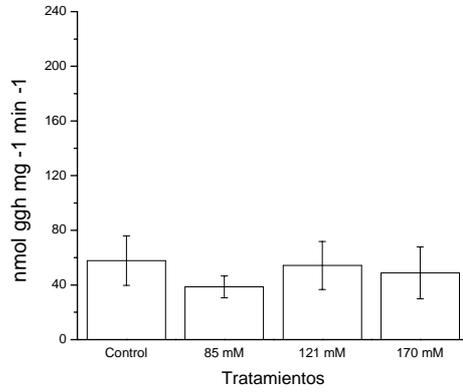
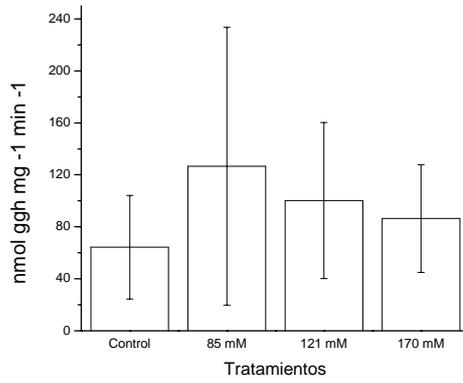


Figura 12. Actividad específica de glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2) de tejido radicular de plántulas de maíz de la variedad Pinto Salvatore. Las gráficas A, B y C corresponden a los ensayos efectuados con muestras de 10, 15 y 20 días de crecimiento respectivamente.

A 10 días.



B 15 días.



C 20 días.

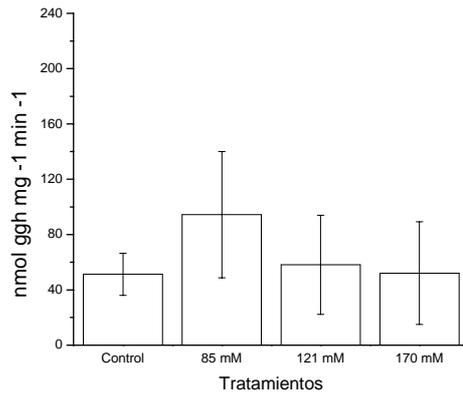
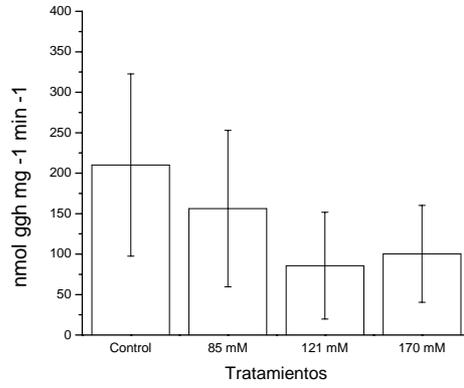
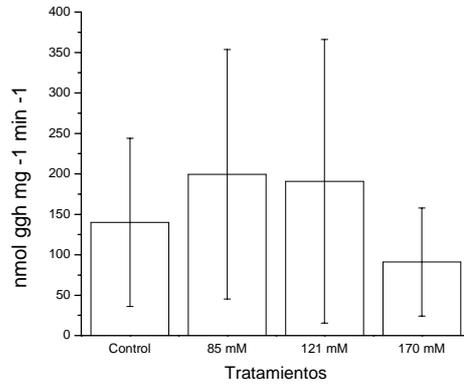


Figura 13. Actividad específica de glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2) de tejido foliar de plántulas de maíz de la variedad Cajete. Las gráficas A, B y C corresponden a los ensayos efectuados con muestras de 10, 15 y 20 días de crecimiento respectivamente.

A 10 días.



B 15 días.



C 20 días.

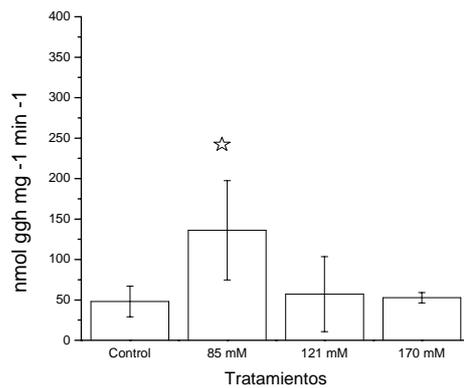


Figura 14. Actividad específica de glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2) de tejido radicular de plántulas de maíz de la variedad Cajete. Las gráficas A, B y C corresponden a los ensayos efectuados con muestras de 10, 15 y 20 días de crecimiento respectivamente. El * indica una diferencia significativa entre los valores del tratamiento salino y de las plántulas control ($p \leq 0.01$).

Evaluación inicial de la expresión del gen de glutamino sintetasa (GS 1-4)

Los resultados iniciales de la expresión del gen de GS se muestran en la tabla 5 del *Anexo ii*.

VII Discusión

La salinidad afecta el crecimiento de las plantas ya sea disminuyendo la disponibilidad de agua a las raíces debido al efecto osmótico de la sal en el exterior de la planta, o bien al ejercer un efecto tóxico por la acumulación excesiva en la planta. Estos efectos pueden influir de manera directa o indirecta en otros procesos fisiológicos como pueden ser la germinación, la fotosíntesis, la respiración y la acumulación de metabolitos (Hussain *et al.*, 2003 y Cramer *et al.*, 1994). Algunos investigadores han evaluado a plántulas de maíz con 14 días de crecimiento y expuestas a una concentración de sal de 100 mM y han confirmado que disminuyen los parámetros de biomasa registrada como peso seco, concentración de clorofila, contenido de nitrógeno así como la toma de nitrato (Khan y Srivastava 1998).

Algunos autores como Sweby y colaboradores (1994) propusieron que la inhibición del crecimiento se podría deber a que el ión Cl^- suprime la entrada de NO_3^- al competir e inhibir la entrada de este nutriente. Esta suposición ha sido recientemente corroborada por Debouba (Debouba *et al.*, 2006).

De esta manera, el crecimiento es un parámetro que se ve correlacionado con la cantidad de sal presente en el medio. Esto se puede observar en la figuras 4, 5 y 6 en donde el tamaño de las plántulas control siempre es mayor al de las plántulas expuestas a diferentes concentraciones de NaCl. En algunos casos este tamaño llegó ser casi la mitad del control para las plantas expuestas a una concentración de 170 mM y un tiempo de crecimiento de 15 días (figuras 5 y 6).

El maíz (*Zea mays* L.) es considerada como un planta moderadamente sensible a la sal (Botella *et al.*, 1997). Sin embargo, existen variedades de maíz que son más tolerantes o sensibles al NaCl. Esta característica se ha correlacionado con la capacidad para la incorporación de K^+ (Botella *et al.*, 1997), Na^+ (Cramer *et al.*, 1994) o la relación que presentan para tomar los iones $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Cramer, 1994).

Las diferentes razas o variedades de maíz presentan características fisiológicas propias de la región en donde se cultivan. Al existir estas variantes en este trabajo se evaluaron dos variedades de maíz que crecen en condiciones hídricas diferentes. Una de ellas, la variedad Cajete crece en el estado de Oaxaca con requisitos de relativa poca agua y la otra variedad, Pinto Salvatore, crece en el estado de Puebla con requisitos hídricos mayores a la anterior (Dr. Nestor Espinosa, INIFAP, comunicación personal).

El crecimiento durante las primeras semanas de vida de una planta de maíz parece ser la etapa más sensible a los efectos por sal (Cramer, 1994). Esto se puede apreciar en las figuras 5 y 6 en las que las plántulas expuestas a una concentración de NaCl de 170 mM siempre presentaron una talla mucho menor a los controles.

A pesar de que se utilizaron dos variedades diferentes, en este primer parámetro evaluado no hay una diferencia en cuanto al tamaño que presentan las variedades. Los

valores son muy similares tanto para el tiempo de crecimiento como para las diferentes concentraciones de sal a las que fueron expuestas las plántulas de maíz, de manera que ambas variedades parecen ser igualmente sensibles al efecto del estrés por sal.

Concentración de prolina

Como se ha mencionado anteriormente una respuesta que posiblemente sea universal a los cambios en el potencial osmótico externo es la acumulación de metabolitos que actúan como solutos compatibles. i.e. no interfieren con las reacciones metabólicas normales.

Una de las características de los osmolitos es que su concentración en el citoplasma es proporcional al cambio osmótico que se presenta en el exterior, lo cual podría contribuir a la protección de estructuras y al mantenimiento del balance osmótico lo que permitiría una entrada de agua hacia el interior de la célula (o también una reducción de la salida de agua) (Hasegawa *et al.*, 2000).

En las dos variedades de maíz evaluadas es evidente que en los primeros días de crecimiento se presenta un incremento en los niveles de prolina en las plántulas expuestas a concentraciones crecientes de NaCl ya sea en tejido foliar o radicular (figuras 7 A, 8 A, 9 A y 10 A). Los niveles de prolina son directamente proporcionales a la concentración de NaCl evaluada. Es pertinente destacar que esta tendencia tan marcada y evidente sólo se observa durante el día 10 de crecimiento. El incremento puede llegar a ser de hasta diez veces más que el control como en el tejido radicular de la variedad Cajete (figura 10 A).

Para el siguiente día evaluado que fue el día 15 de crecimiento, la concentración de prolina de las plántulas sometidas a sal parece disminuir respecto a la concentración presentada en el día 10. Esto podría indicar que no se necesita una concentración muy grande de la poza de prolina para contender con el estrés salino (figuras 7 B, 8 B, 9 B y 10 B) en los intervalos estudiados.

La concentración de prolina en el tejido foliar de las dos variedades en el día 20 presenta un comportamiento similar en el que se tiene una mayor concentración para el tratamiento con mayor cantidad de NaCl (170 mM) (figuras 8 C y 10 C). La variedad Cajete presenta un incremento de más de diez veces respecto del control. Esto podría ser también por las características de la variedad que crece en lugares con menos cantidad de agua.

La concentración de prolina en el tejido radicular es mayor para los tratamientos con sal de la variedad Cajete (figura 10 C) El tejido radicular expuesto a una concentración de 121 mM de NaCl en el día 20 de crecimiento presenta un incremento de hasta veinte veces respecto del control. La concentración que presenta el tejido radicular expuesto a una concentración de 170 mM también muestra un valor alto de 110 ng mg^{-1} . La prolina podría continuar teniendo un papel esencial en el ajuste osmótico de la región apical de las raíces (Cerdá *et al.*, 1995) por lo que la concentración se continuaría manteniendo alta. Este comportamiento no se observa tan marcado o con valores similares para la variedad Pinto Salvatore ya que sus valor más alto es de sólo 34 ng mg^{-1} (figura 8 C).

La función que parece presentar la acumulación de prolina en hojas de plantas estresadas con sal contribuiría al balance osmótico del citoplasma, y también ha sido sugerido que tiene un efecto de protección para las enzimas expuestas a altas concentraciones iónicas en las células (Sweby *et al.*, 1994).

Otra función que se ha propuesto para la prolina en células con actividad fotosintética y sometidas a un estrés salino es que presentan una pérdida del equilibrio entre la captura de luz por los sistemas fotosintéticos y la utilización de NADPH para la fijación del carbono lo cual puede alterar el balance de oxido-reducción y promover un evento de fotoinhibición. La síntesis de prolina, seguida de una activación transcripcional de la P5C sintetasa dependiente de NADPH, podría funcionar como una válvula de protección ya que regeneraría el NADP^+ lo cual tendría un efecto protector (Hasegawa *et al.*, 2000).

Es interesante destacar que la vía metabólica a partir de la cual se origina la prolina en plantas parte de una poza de ácido glutámico (Hasegawa *et al.*, 2000; Ashraf y Foolad, 2007).

Poza de glutamato y glutamina.

La rápida utilización de los aminoácidos en maíz implica que la asimilación de amonio debido a la actividad de la glutamino sintetasa opera de una manera eficiente a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta completa, así como en los diferentes estadios de las hojas. Esto podría explicar porqué se tiene una actividad de glutamino sintetasa citosólica prácticamente constante (Hirel *et al.*, 2005a). Este argumento podría explicar también los resultados obtenidos para la poza de glutamina presentados en la tabla 4 en la que a pesar de que las plantas se encuentran sometidas a un estrés por sal esta poza se mantiene constante lo que posiblemente implique una gran tasa de recambio.

Por otra parte la poza de glutamato sí se incrementó conforme se incrementaron las concentraciones de sal de los tratamientos. Esto es interesante porque el glutamato es el precursor de la prolina y como se ha visto en las figuras 7 a 10 la concentración de prolina también se incrementa en los tratamientos con NaCl.

Actividad específica de glutamino sintetasa.

El nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Debido a que glutamino sintetasa cataliza los primeros pasos en la asimilación del nitrógeno inorgánico y debido a la movilidad de la amida de la glutamina la cual es utilizada como donador de residuos amino para sintetizar un número esencial de metabolitos como aminoácidos, ácidos nucleicos y amino azúcares, glutamino sintetasa es para las plantas un factor principal para la productividad vegetal y de esta forma para el abastecimiento de nitrógeno de todos los animales en la tierra. Por esta razón, la importancia de la glutamino sintetasa vegetal es comparable con la de la ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxidasa (Unno *et al.*, 2006). De esta manera, la asimilación de nitrógeno y carbono en materia orgánica son procesos críticos para el crecimiento vegetal,

lo cual tiene efectos importantes en la productividad vegetal, biomasa y producción agrícola (Oliveira *et al.*, 1997).

En este sentido otros investigadores han utilizado la actividad de la glutamino sintetasa como marcador bioquímico representativo para evaluar el estado de nitrógeno de una planta en un estadio particular de su desarrollo (Hirel *et al.*, 2005b; Hirel *et al.*, 2001; Hirel *et al.*, 2005a). Este grupo de investigadores ha trabajado con diferentes genotipos de maíz y han encontrado que existe una fuerte correlación entre el contenido total de nitrógeno, clorofila, proteína soluble y la actividad de glutamino sintetasa.

Los datos de actividad específica de glutamino sintetasa de tejido foliar de la variedad Pinto presentan una tendencia hacia la uniformidad. Esto se aprecia más para los días 10 y 20 de crecimiento (figura 11 A y 11 C), por lo que se puede decir que no hay un cambio drástico en la actividad, inclusive con 170 mM de NaCl.

La actividad específica de glutamino sintetasa de tejido foliar de la variedad Cajete presenta valores ligeramente mayores en las plántulas expuestas a una concentración de 85 mM tanto para el día 15 como 20 de crecimiento (figura 13 B y 13 C). Sin embargo, la tendencia es también a tener valores cercanos a los del control. Es decir no se observa un cambio significativo en la actividad de la enzima de plantas expuestas a concentraciones crecientes de NaCl.

En años recientes algunos investigadores han propuesto a la glutamino sintetasa como un componente determinante para la tolerancia al estrés por sal, ya que en estudios con variedades de arroz sensibles y tolerantes a la sal han encontrado que la actividad enzimática se ha incrementado o reducido en las variedades tolerante y sensible respectivamente. También han demostrado que una disminución en la regulación de la glutamino sintetasa y, en consecuencia, una reducción en la actividad de la enzima puede resultar en una menor producción de prolina, lo cual podría explicar en parte su sensibilidad a la sal (Hoai *et al.*, 2003).

Por otra parte también se tiene evidencia de que plantas transgénicas de tabaco expresando un ARNm en antisentido del gen GS1 producen menos prolina que el tipo silvestre y fueron más sensibles al estrés salino (Yan *et al.*, 2005), por lo que queda de manifiesto que glutamino sintetasa podría ser importante para la síntesis de los precursores de prolina el cual sirve como un osmolito protector (Yan *et al.*, 2005).

Otro grupo de investigadores no encontró diferencia entre la actividad de la glutamino sintetasa de plántulas de maíz control y plántulas sometidas a un estrés intenso en corto tiempo (150 mM de NaCl durante 12 horas) (Miranda-Ham y Loyola-Vargas, 1994).

La actividad específica de glutamino sintetasa de tejido radicular presenta una tendencia a disminuir conforme se incrementa la concentración de sal en las plántulas (figura 12 A y 14 A). Sin embargo, para la variedad Pinto Salvatore a los 15 días de crecimiento se aprecia un incremento en la actividad de la enzima de raíces expuestas a una concentración de sal de 121 y 170 mM (figura 12 B). Para el día 20 de crecimiento sólo se observa una ligera disminución en la actividad de la enzima de raíces expuestas a 85 mM

de NaCl (figura 13 C) aunque los valores de las siguientes concentraciones son similares al control.

Para la variedad Cajete en el día 15 de crecimiento se tiene un aumento en la actividad de la enzima de tejido radicular expuesto a las concentraciones de 85 y 121 mM de NaCl (figura 14 B). En el día 20 de crecimiento la actividad de la enzima de plántulas expuestas a 85 mM de NaCl presenta mayor actividad que el control; los restantes tratamientos presentan valores similares al control (figura 15 C).

Excepto para el día 10 de crecimiento para los días 15 y 20 no se aprecia una tendencia en las actividades registradas y sí algunos valores que son cercanos a los del control.

Algunos autores han demostrado que después de una exposición a largo plazo con 50 mM de NaCl en plantas de *Vigna unguiculata* la actividad de glutamino sintetasa no es un factor limitante para el crecimiento vegetal. Sin embargo, establecen que en la incorporación de amonio el papel del ciclo GS/GOGAT sí es importante para la síntesis de nuevos aminoácidos (Silveira *et al.*, 2001)

En un análisis de tipo proteómico, glutamino sintetasa es una proteína que se encuentra en una menor proporción en raíces de arroz expuestas a una concentración de 150 mM de NaCl respecto de plantas control (Yan *et al.*, 2005).

En plántulas de maíz con un tratamiento de 25 y hasta 100 mM de NaCl y evaluando el patrón proteómico mediante electroforesis en dos dimensiones, se observó un incremento en la concentración de glutamino sintetasa (Zörb *et al.*, 2004).

Por otra parte, el descubrimiento de que los genes para las enzimas glutamino sintetasa cloroplásticas y citosólicas son expresados diferencialmente en diferentes tipos celulares sugiere que los estudios bioquímicos tradicionales, los cuales comienzan con la disrupción de tejidos, podrían mezclar artificialmente isoenzimas que podrían no coexistir en el mismo tipo celular *in vivo* (Lam *et al.*, 1995)

Glutamino sintetasa de maíz está codificada por cinco genes para la enzima denominada GS1 y uno para la enzima cloroplástica denominada GS2. GS1 se podría ensamblar en heterooctámeros *in vivo* (Muhitch y Felker, 1994). Esta hipótesis parece ser corroborada al tener actualmente la estructura atómica de la glutamino sintetasa de maíz, la cual es un decámero compuesto por dos anillos pentaméricos (Unno *et al.*, 2006). Esta estructura difiere de la reportada también en el año de 2006 para la estructura tridimensional de la glutamino sintetasa de chícharo, la cual parece presentar una estructura octamérica con dos anillos tetaméricos (Llorca *et al.*, 2006).

La glutamino sintetasa cloroplástica parece participar en la tolerancia a la sal. Esto se ha demostrado con plantas de arroz transgénicas que sobreexpresan a la enzima en 1.5 veces más que el control y presentan un incremento en la capacidad fotorrespiratoria (Hoshida *et al.*, 2000). Los resultados muestran que las plantas de arroz control al ser expuestas a una concentración de 150 mM de NaCl durante dos semanas pierden por

completo su fotosistema II. Las plantas de arroz transgénicas al ser expuestas a la misma concentración retienen en un 90 % la actividad de su fotosistema II. Si se agrega un inhibidor de la actividad de glutamino sintetasa a las plantas transgénicas estas presentan un comportamiento similar al control. Así la promoción de la fotorrespiración confiere resistencia a la sal en las plantas, ya que el paso limitante parece ser la reasimilación de NH_4^+ por la glutamino sintetasa cloroplástica.

En plantas C4, la glutamino sintetasa de las células de la vaina estarían involucradas en la asimilación del NH_4^+ producido por la fotorrespiración (Oaks, 1993). Es interesante ya que maíz que es una planta tipo C4 presenta también un metabolismo tipo C3 en las primeras hojas (Nelson y Langdale, 1992). Esto parece ser corroborado por el tipo de enzimas que se presentan, en las hojas superiores, ya que presenta enzimas típicas del metabolismo C4 y en las hojas inferiores enzimas típicas del metabolismo C3 (Crespo *et al.*, 1979).

Expresión del gen de glutamino sintetasa

La regulación de la expresión de los genes de la glutamino sintetasa parece ser compleja y puede mostrar diferentes patrones de comportamiento en diferentes estados fisiológicos de la planta (Sakakibara *et al.*, 1992b, Teixeira *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006).

Sin embargo, los resultados que se obtuvieron en este estudio de la expresión del gen GS_{1-4} de plántulas de maíz de la variedad Cajete (tabla 5, *Anexo ii*) muestran un patrón muy estable y sin cambios significativos ya sea en el tejido foliar o en el tejido radicular y para los distintos tratamientos con NaCl. Por lo que en las condiciones evaluadas en el presente estudio, no parece existir un cambio en la transcripción de este gen.

Como se mencionó líneas arriba, la rápida utilización de amino ácidos en maíz podría implicar que la asimilación de amonio a través de la enzima glutamino sintetasa esté operando de una manera eficiente en la planta de maíz (Hirel *et al.*, 2005^a; Ortega, 2001).

VIII Conclusión

Se comprobó que la exposición de plántulas de maíz durante los primeros 15 días de crecimiento a concentraciones crecientes de NaCl (80 mM, 121 mM y 170 mM) tuvo como efecto un incremento en los valores de concentración total de prolina así como una disminución en el crecimiento de las plántulas expuestas.

A pesar de lo anterior, la actividad de glutamino sintetasa así como la expresión de su gen presentaron valores relativamente uniformes entre el control y los diversos tratamientos en las condiciones evaluadas en el presente estudio. Ello podría indicar que a pesar de que estas plantas estuvieron expuestas a una concentración creciente de sal, la actividad basal de GS les permitiría contender con este tipo de estrés.

IX Anexos

Anexo i Valores aparentes de K_M de glutamino sintetasa

Fuente de la enzima	Peso molecular	$S_{20 w}$	P. M. Sub-unidades	No. Sub-unidades	Cis-teinas por sub-unidad	Valores aparentes de K_M ensayo con Mg^{2+} (mM)					pH óptimo (sintetasa)	
						Glu-tamato	NH_4	ATP	Mn^{2+}	Mg^{2+}		
<i>Pisum sativum</i> semilla	350,000	14.0	45,000	8	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pisum sativum</i> semilla	450,000	17.5	-	-	-	5	0.05	-	-	-	-	-
<i>Pisum sativum</i> semilla	450,000	16.95	-	-	-	14	0.039	-	5.5	7.0-7.6	-	-
<i>Pisum sativum</i> Hoja	330,000-370,000	-	-	-	-	3.5-12.4	0.020	0.14-0.65	5.2	7.2-8.2	-	-
<i>Glycine max</i> nódulo	376,000	14.3-14.5	47,300	8	4	-	-	-	5.0	7.8-8.5	-	-
<i>Hordeum vulgare</i> Hojas GS-I	349,000	14.04	-	-	-	5.4	0.05	0.6	-	-	-	-
<i>Hordeum vulgare</i> Hojas GS-II	363,000	14.13	-	-	-	1.0, 20.0	0.05	0.6	-	-	-	-
<i>Lemna minor</i>	360,000	14.3	45,000	8	4	3.4-13.3	0.012-0.015	0.8-1.3	-	-	-	-
<i>Chlorella</i>	320,000	-	53,000	6	?	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cucurbita pepo</i> Hojas GS-I	480,000	-	58,000	8	-	13	-	-	-	-	7.25	-
<i>Cucurbita pepo</i> Hojas GS-II	370,000	-	50,000	8	-	46	-	-	-	-	7.5	-
<i>Escherichia coli</i>	600,000	20.3	50,000	12	5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anabaena cylindrica</i>	591,000	-	49,000	12	10	2	1	-	-	-	-	-
Oveja cerebro	392,000	15.0	49,000	8	12	2.5	0.18	2.3	-	-	7.0-7.4	-

Tomado de Miflin *et al.*, 1981.

Tabla 5.- Valores aparentes de K_M de glutamino sintetasa de varios organismos. Se reportan los valores de K_M aparente así como el número de subunidades que conforman a la enzima en diferentes organismos.

Anexo ii

Evaluación inicial de la expresión del gen de glutamino sintetasa (GS₁₋₄)

A partir de un estudio de densitometría realizado con las placas autoradiográficas de las pruebas de northern se estableció que la mancha de ARNm del control equivale a una unidad y a partir de ahí, se evaluó semicuantitativamente la cantidad de ARNm de GS₁₋₄ de los tejidos foliar y radicular expuestos a las diferentes concentraciones de NaCl.

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 5. Se observa que para tejido foliar no hay un cambio considerable en todos los tratamientos con NaCl tanto para el día 10 como para el día 15 de crecimiento. Para el día 20 los valores registrados son ligeramente menores al del control

En tejido radicular el patrón de expresión para el día 10 sólo presenta un incremento mayor en la concentración de 170 mM.

Para el día 15 de crecimiento los tratamientos con 85 y 121 mM de NaCl presentan un incremento de 0.7 veces y el tratamiento con 170 mM de NaCl presenta el doble de cantidad de ARNm de GS₁₋₄. Es interesante destacar que para el día 20 los valores son ligeramente menores con respecto del control.

Días	Tratamiento (NaCl)	Tejido Foliar	Tejido Radicular
10	Control	1.0	1.0
	85 mM	1.1	1.3
	121 mM	1.2	1.1
	170 mM	1.0	1.5
15	Control	1.0	1.0
	85 mM	0.92	1.7
	121 mM	1.3	1.7
	170 mM	1.1	2.19
20	Control	1.0	1.0
	85 mM	0.8	0.82
	121 mM	0.86	0.97
	170 mM	0.98	0.9

Tabla 5. Valores relativos de densitometría de placas de northern correspondientes a la cantidad de ARNm de la sonda GS₁₋₄. Los valores representan el promedio de por lo menos 5 eventos realizados en días diferentes. El numeral 1 corresponde al tamaño de la mancha del mensajero de glutamino sintetasa extraído del control. La variedad evaluada fue Cajete.

X Referencias

- Abrol I. P., J.S.P. Yadav y F. J. Massoud. 1988. Salts- affected soils and their management. FAO soils bulletin 39. FAO. Roma. En: <http://www.fao.org/docrep/x5871e/x5871e00.htm>
- Acaster M. A. y P. D. J. Weitzman. 1985. Kinetic analysis of glutamine synthetases from various plants. *FEBS* **189**(2): 241-244.
- Ashraf M. y P. J. C. Harris. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* **166** (1): 3-16.
- Ashraf M. y M. R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Env. and Exp. Bot.*, **59** (2): 206-216.
- Bates L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and soil* **39**: 205-207
- Bernhard W. R. Y y P. Matilde. 1994. Differential expression of glutamine synthetase genes during the senescence of *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. *Plant Science*, **98**: 7- 14.
- Biesiadka J. and A. B. Legocki. 1997. Evolution of the glutamine synthetase gene in plants. *Plant Science*, **128**: 51-58.
- Bohnert H.J. y B. Shen. 1999. Transformation and compatible solutes. *Scientia Hortic.* **78**: 237-60.
- Borsani O., V. Valpuesta y M. A. Botella . 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* **73** (2): 101-115.
- Botella M. A., V. Martínez. J. Pardines and A. Cerdá. 1997. Salinity induced potassium deficiency in maize plants. *Plant. Physiol.*, **150**: 200-205.
- Bressan R. A., P. M. Hasegawa and J. M. Pardo. 1998. Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends in Plant Science.* **3**: 411-12.
- Buring P., 1978. Food production potential of the world. En: Radhe Shina (Ed.). The world food problem; consensus and conflict. Pergamon Press. pp 477- 485.
- Canovas F., M., C. Avila , F. R. Canton, R. A. Canas y F. de la Torre. 2007. Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *J. Exp. Bot.*, : 9 MAY 2007. DOI: 10.1093/jxb/erm051.
- Cardon G. E., J. G. Davis, T.A. Bauder y R.M. Waskom. 2004. Managing saline soils No. 0.503. Crop series, Soil. Colorado State University Cooperative Extension. En: <http://www.ext.colostate.edu/pubs/crops/00503.pdf>
- Carter D. L., 1975. Problems of salinity in agriculture. En: Plants in saline environments. edited by A. Poljakoff-Mayber and Gale. Springer-Verlag, N.Y. pp. 25- 35.
- Cerdá A., J. Pardines, M. A. Botella and V. Martinez. 1995. Effect of potassium on growth water relations and the inorganic and organic solute contents for two maize cultivars grown under saline conditions. *J. of Plant Nut.*, **18**(4): 839- 851.
- Cock J. M., R. M. Mould, M. J. Bennett y J. V. Cullimore. 1990. Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of *Phaseolus vulgaris* following changes in ammonium supply and infection with various *Rhizobium* mutants. *Plant Mol. Biol.*, **14**: 549- 560.
- Cramer G. R., 1994. Response of maize (*Zea mays* L.) to salinity. En: Handbook of plant and crop stress. edited by M. Pessaraki, Marcel Dekker Inc., N.Y., U.S.A. pp. 449- 459.
- Cramer G. R., G. J. Alberico and C. Schmidt. 1994. Salt Tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. *Aust. J. Plant Physiol.*, **21**: 675-692.
- Crespo H. M., M. Frean, C. F. Cresswell and J. Tew. 1979. The occurrence of both C₃ and C₄ Photosynthetic characteristics in a single *Zea mays* plant. *Planta* **147**: 257-263.
- Cheeseman J. M., 1988. Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.*, **87**: 547-550.
- Chrispeels M.J., N.M. Crawford y J.I. Schroeder. 1999. Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell* **11**: 661-75.
- Debouba M., H. Gouia, A. Suzuki y M. H. Ghorbel. 2006. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. *J. of Plant Physiol.* **163** (12): 1247-1258.
- Dudley L. M., 1994. Salinity in the soil environment. En: Handbook of plant and crop stress. edited by M. Pessaraki, Marcel Dekker Inc., N.Y., U.S.A. pp. 13- 15.
- Epstein E. 1998. How calcium enhances plant salt tolerance. *Science* **280**: 1906-1907.
- Evangelou V. P., 1994. Influence of sodium on soils of humid regions. En: Handbook of plant and crop stress.

- edited by M. Pessaraki, Marcel Dekker Inc., N.Y., U.S.A. pp. 31- 37.
- FAO 2005. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt affected soils. Rome Italy: FAO Land and plant nutrition management service. En: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>
- Flowers T.J. y A.R. Yeo. 1992. Solute transport in plants. Glasgow, Scotland: Blackie. 176 pp.
- Ford C.W., 1984. Accumulation of low molecular weight solutes in water stress tropical legumes. *Phytochem* **23**:1007- 15.
- Forde B. G. y J. V. Cullimore. 1989. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology*. vol **6**: 247-296.
- Francois L. E. y E. V. Mass, 1994. Crop response and management on salt-affected soils. En: Handbook of plant and crop stress. edited by M. Pessaraki, Marcel Dekker Inc., N.Y., U.S.A. pp. 149- 181.
- Fu J., R. Sampalo, F. Gallardo, F.M. Canovas y E. G. Kirby. 2003. Assembly of a cytosolic pine glutamine synthetase holoenzyme in leaves of transgenic poplar leads to enhanced vegetative growth in young plants. *Plant Cell Environ.*, **26**(3): 411- 418.
- Goddard T., 2006. Salinity Classification, Mapping and Management in Alberta. En: [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/sag3267](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/sag3267) . Consultada en mayo 2007.
- Hadži-Taškovic Šukalovic V., 1986. Activity and distribution of nitrogen-metabolism enzymes in the developing maize kernel. *Physiol. Plant.* **67**: 247-252.
- Hare P.D y W. A. Cress. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**: 79-102.
- Harrison J., P. Crescenzo, M. A. O. Sené y B. Hirel. 2003. Does lowering glutamine synthetase activity in nodules modify nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicus*?. *Plant Physiol.***133**:253-262.
- Hasegawa P. M. and R. A. Bressan, Zhu J-K and H. J. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**: 463-99.
- Hirel B., A. Martin, T. Tercé-Laforgue, M-G. González-Moro J. M. Estavillo and J-M. Estavillo. 2005a. Physiology of maize I: A comprehensive and integrated view of nitrogen metabolism in a C4 plant. *Physiologia Plantarum* **124**: 167–177.
- Hirel B., B. Andrieu, M. Valadier, S. Renard, I. Quilleré, M. Chelle, B. Pommel, C. Fournier y J. L. Drouet. 2005b. Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. *Physiologia Plantarum* **124**: 178–188.
- Hirel B., C. Bouet, B. King, D. Layzell, F. Jacobs and D. P. S. Verma. 1987. Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J.*, **6**(5): 1167-1171
- Hirel B., P. Bertin, I. Quilleré, W. Bourdoncle, C. Attagnant, C. Dellay, A. Gouy, S. Cadiou, C. Retalliau, M. Falque and A. Gallais. 2001. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiol.*, **125**: 1258–1270.
- Hoai N.T.T., I. S. Shim, K. Kobayashi y U. Kenji. 2003. Accumulation of some nitrogen compounds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*. **41** (2): 159-164.
- Hoshida H., Y. Tanaka, T. Hibino, Y. Hayashi, A. Tanaka, T. Takabe and T. Takabe. 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Molecular Biology* **43**: 103–111.
- Hussain N., A. Ali, G. Sarwar, F. Mujeeb y M. Tahir. 2003. Mechanism of salt tolerance in rice. *Pedosphere* **13** (3): 233-238.
- Jones J.B., 1982. Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *J Plant Nutr* **5**:1003–1030.
- Kanamori T. y H. Matsumoto. 1972. Glutamine synthetase from rice plant roots. *Arch. of Biochem. Biophys.* **125**: 404-412.
- Khan M. G. and H. S. Srivastava. 1998. Changes in growth and nitrogen assimilation in maize plants induced by NaCl and growth regulators. *Biol. Plant.*, **41**(1): 93-99.
- Kumada Y., D.R. Benson, D. Hillemann, T.J. Hosted, D. A. Rochefort, C.J. Thompson, W. Wohlleben and Y. Tateno. 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**: 3009- 3013.
- Lam H., K. Coschigano, C. Schultz, R. Melo-Oliveira, G. Tjaden, I. Oliveira, N. Ngai, M. Hsieh and G. Coruzzi. 1995. Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell*, **7**: 887-898.
- Lara M., J. V. Cullimore, P. J. Lea, B. J. Mifflin, A. W. B. Johnston y J. W. Lamb. 1983. Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L., *Planta* **157**: 254- 258.

- Lea P. J. and B. J. Mifflin. 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**: 614-616.
- Lea P. J., 1990. Enzymes of ammonia assimilation. En: Methods in plant biochemistry. vol **3**. Dey P. M. and J. B. Harborne Edits., Academic Press. London. pp. 257-276.
- Lea P. J., R. D. Blackwell, A. J. S. Murray and K. W. Joy, 1989. The use of mutants lacking glutamine synthetase and glutamate synthase to study their role in plant nitrogen metabolism. En: Recent advances in phytochemistry. E.E. Conn Ed. vol **23**. Plenum Press. N.Y. pp. 157-189.
- Levitt J., 1980. Salt and ion stresses. In: Levitt J. (ed.), Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol. II, Academic Press.
- Li M., R. Villemur, P. J. Hussey, C. D. Silflow, J. S. Gantt and D. P. Snustad. 1993. Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. *Plant Mol. Biol.* **23**: 401-407.
- Lightfoot D. A., N. K. Green y J. V. Cullimore. 1988. The Chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Mol. Biol.*, **11**: 191- 202.
- Limami A.M., C. Rouillon, G. Glevarec, A. Gallais y B. Hirel. 2002. Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of cytosolic glutamine synthetase. *Plant Physiol.* **130** (4): 1860-1870.
- Linka M. y A. P. M. Weber 2005. Shuffling ammonia between mitochondria and plastids during photorespiration. *Trends in Plant Science*. **10** (10): 461-465.
- Lyegar E. R. R. and M. P. Reddy, 1994. Crop response to salt stress: seawater application and prospects. En: Handbook of plant and crop stress. edited by M. Pessarakli, Marcel Dekker Inc., N.Y., U.S.A. pp. 189-193.
- Llorca O., M. Betti, J. M. González, A. Valencia, A. J. Márquez y J.M. Valpuesta. 2006. The three-dimensional structure of an eukaryotic glutamine synthetase: functional implications of its oligomeric structure. *Journal of Structural Biology*. **156**: 469- 479.
- Magasanik B., 1988. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. *Trends Biochem. Sci.*, **13**: 475-479.
- Manzoor A. S., 1994. Nutrient uptake by plants under stress conditions En: Handbook of plant and crop stress. edited by M. Pessarakli, Marcel Dekker Inc., N.Y., U.S.A. pp. 227- 237.
- Marsolier M. C., E. Carrayol y B. Hirel. 1993. Multiple functions of promoter sequences involved in organ-specific expression and ammonia regulation of a cytosolic soybean glutamine synthetase gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Journal*. **3**: 405-14.
- Martin A.,J. Lee, T. Kichey, D. Gerentes, M. Zivy, C. Tatout, F. Dubois, T. Balliau, B. Valot, M. Davanture, T. Tercé-Laforgue, Isabelle Quilleré, M. Coque, A. Gallais, M. Gonzalez-Moro, L. Bethencourt, D. Z. Habash, P.J. Lea, A. Charcosset, P. Perez, A. Murigneux, H. Sakakibara, K. J. Edwards y B. Hirel. 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell*. **18**: 3252- 3274.
- McNally S. F., B. Hirel, P. Gadal, A. F. Mann and G. R. Stewart. 1983. Glutamine synthetases of higher plants. *Plant Physiol.* **72**: 22-25.
- Meister A., 1974. In "The Enzymes" (P.D. Boyer ed.), Vol 10. pp 699-754. Academic Press, New York.
- Mifflin B. J. and P. J. Lea, 1980. Ammonia Assimilation. En: The Biochemistry of plants vol **5**: B. J. Mifflin Ed., Academic Press N.Y. pp. 169-202.
- Mifflin B. J., R. M. Wallsgrove and P. J. Lea. 1981. Glutamine metabolism in higher plants. *Curr. Topics in Cellular regulation*, **20**: 1-41. Stadman E. R. & Horecker L. eds. N.Y. Academic press.
- Miranda-Ham M. de L. and V. M. Loyola-Vargas. 1994. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase activities in maize under water and salt stress. *Phyton* **56**: 7-15.
- Muhitch M. J. and F. C. Felker. 1994. Influence of nitrogen source on the growth, prolamin content, and glutamine synthetase isozyme profiles of endosperm-derived suspension cultured of maize. *J. Plant Physiol.*, **144**: 215-221.
- Muhitch M. J., 1988. Glutamine synthetase activity of the endosperm, embryo and pedicel-placento-chalazal regions of developing maize (*Zea mays*) kernels. *Physiol. Plant.* **74**: 176-180.
- Muhitch M. J., 1989. Purification and characterization of two forms of glutamine synthetase from the pedicel region of maize (*Zea mays* L.) kernels. *Plant Physiol.*, **91**: 868-875.
- Nato F., B. Hirel, A. Nato y P. Gadal. 1984. Chloroplastic glutamine synthetase from tobacco leaves: a glycosylated protein. *FEBS Lett.*, **175**: 443- 446.
- Nelson T. y J. A. Langdale. 1992. Developmental genetics of C₄ photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*

- Plant Mol. Biol.* **43**: 25-47.
- Niu X., R.A. Bressan, P.M. Hasegawa y J.M. Pardo. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* **109**: 735-42.
- Nuccio M.L, D. Rhodes, S. D. McNeil y A. D. Hanson. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Op. in Plant Biol.* **2** (2): 128-134.
- O'Neal D. and K. W. Joy. 1973. Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH Optima. *Arch. of Biochem. Biophys.* **159**: 113-122.
- Oaks A., 1993. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.*, **72**: 739-750.
- Oliveira I. C. y G. M. Coruzzi. 1999. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **121** (1): 301-309.
- Oliveira I. C., H.-M. Lam, K. Coschigano, R. Melo-Oliveira and G. Coruzzi. 1997. Molecular-genetic dissection of ammonium assimilation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.*, **35**(3): 185-198.
- Oliveira I. C., T. Brears, T. J. Knight, A. Clark y G. M. Coruzzi. 2002. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. *Plant Physiol.*, **129**(3): 1170- 1180.
- Organización de las Naciones Unidas. 1977. Desertification; Its causes and consequences. Pergamon Press, Oxford. 448 p.
- Ortega J.L., S. J. Temple y C. Sengupta-Gopalan. 2001. Constitutive overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS1) gene in transgenic alfalfa demonstrates that GS(1) may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover. *Plant Physiol.*, **126**(1): 109- 121.
- Parida A. K. y A. B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **60** (3): 324-349.
- Pesole G., C. Gissi, C. Lanave and C. Saccone. 1995. Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. *Mol. Biol. Evol.*, **12**(2): 189-197.
- Pesole G., M. P. Bozzetti, C. Lanave, G. Preparata and C. Saccone. 1991. Glutamine synthetase gene evolution: A good molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 522-526
- Rastogi R., P. S. Chourey and M. J. Muhitch. 1998. The maize glutamine synthetase GS1-2 gene is preferentially expressed in kernel pedicels and is developmentally-regulated. *Plant Cell Physiol.*, **39**(4): 443-446.
- Redinbaugh M. G. and W. H. Campbell. 1993. Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiol.*, **101**: 1249-1255.
- Sakakibara H., K. Kobayashi, A. Deji and T. Sugiyama. 1997. Partial characterization of the signaling pathway for the nitrate-dependent expression of genes for nitrogen-assimilatory enzymes using detached maize leaves. *Plant Cell Physiol.*, **38**(7): 837-843.
- Sakakibara H., S. H. Shimizu, T. Hase, Y. Yamazaki. T. Tajao, Y. Shimonishi and T. Sugiyama. 1996. Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. *J. Biol. Chem.*, **271**(47): 29561-29568.
- Sakakibara H., S. Kawabata S., H. Takahashi, T. Hase and T. Sugiyama. 1992. Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues., *Plant Cell Physiol*, **33**(1): 49-58.
- Sakakibara H., S. Kawabata S., T. Hase and T. Sugiyama. 1992. Differential effects of nitrate and light on the expression of the glutamine synthetases and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Plant. Cell Report.*, **33**(8): 1193-1198.
- Sakamoto A., G. Takeba, D. Shibata, K. y K. Tanaka. 1990. Phytochrome-mediated activation of the gene for cytosolic glutamine synthetase (GS1) during imbibition of photosensitive lettuce seeds. *Plant Mol. Biol.* **15**: 317- 323.
- Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schachtman D. P. and J. I. Schroeder. 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, **370**: 655-658.
- Serrano R., 1996. Salt Tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. of Cyt.* **165**: 1-52.
- Shainberg I., 1975. Salinity of soils-effects of salinity on the physics and chemistry of soils. En: Plants in saline environments. edited by A. Poljakoff-Mayber and Gale. Springer-Verlag, N.Y. pp. 39- 45.
- Shaul O. and G. Galili. 1992. Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant

- desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* **100**: 1157-1163.
- Silveira J. A. G., A. R. B. Melo, R. A. Viegas y J. T. A. Oliveira. 2001. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Env. and Exp. Bot.*, **46** (2): 171-179.
- Silveira J.A.G., A.R.B. Melo, R.A. Viégas y J.T.A. Oliveira. 2001. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Environmental and Experimental Botany* **46**: 171- 179.
- Snustad D. P., J. P. Hunsperger, B. M. Chereskin and J. Messing. 1988. Maize glutamine synthetase cDNAs: Isolation by direct genetic selection in *Escherichia coli*. *Genetics.* **120**: 1111-1124.
- Stewart G. R., A. F. Mann and P. A. Fentem. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and glutamate synthase. En: The Biochemistry of plants vol **5**: B. J. Mifflin Ed., Academic Press N.Y. pp. 271-327.
- Stewart G.R. y D. Rhodes. 1977. A comparison of the characteristics of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase from *Lemna minor* L. *New Phytol.* **79**: 257- 268.
- Subbarao G. V. and Ch. Johansen, 1994. Startegies and scope for improving salinity tolerance in crop plants. En: Handbook of plant and crop stress. edited by M. Pessaraki, Marcel Dekker Inc., N.Y., U.S.A. pp. 559- 579.
- Sugiharto B. y T. Sugiyama. 1992. Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpruvate carboxilase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. *Plant Physiol.*, **98**: 1403- 1408.
- Sukanya R., M. Li and P. Snustad., 1994. Root and shoot-specific responses of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonium. *Plant Molecular Biology*, **26**: 1935-1946.
- Sweby D. L., B. I. Hockett and M. P. Watt. 1994. Effects of nitrogen nutrition on salt-stressed *Nicotiana tabacum* var. Samsun *in vitro* plantlets. *J. Exp. Bot.* **45**(276): 995-1008.
- Szabolcs I., 1994. Soils and salinization. En: Handbook of plant and crop stress. edited by M. Pessaraki, Marcel Dekker Inc., N.Y., U.S.A. pp 3-11.
- Ta Ch. T., 1991. Nitrogen metabolism in the stalk tissue of maize. *Plant Physiol.*, **97**: 1375-1380.
- Taira M., U. Valtersson, B. Burkhardt y R. A. Ludwig. 2004. *Arabidopsis thaliana* GLN2-Encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell* **16**: 2048-2058.
- Tanji K.K., 1995. Foreword. En: The salinization of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. Centre for resources and environment studies. The Australian national university. Pub. Cab. International, Wallingford, Oxon.
- Teixeira J., S. Pereira, F. Cánovas y R. Salema. 2005. Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. c.v. Désirée) plants: cell- and organ- specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *J. Exp. Botany.* **56** (412): 663- 671.
- Tingey S. V., E. L. Walker y G. M. Coruzzi. 1987. Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.* **6**: 1- 9.
- Tumer N.E., S.J. Robinson y R. Haselkorn. 1983. Different promoters for the Anabaena glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen. *Nature* **306**: 337- 342.
- UNCCD. 2007. United Nations Convention to Combat Desertification En: <http://www.unccd.int/> . Consultada en Mayo 2007.
- Unno H., T. Uchida, H. Sugawara, G. Kurisu, T. Sugiyama, T. Yamaya, H. Sakakibara, T. Hase y M. Kusunoki. 2006. Atomic structure of plant glutamine synthetase. *Journal of Biological Chemistry.* **281**(39): 29287- 29296.
- Vincent R., V. Fraiser, S. Chaillou, M. A. Limami, E. Deleens, B. Phillipson, C. Douat, J. Boutin y B. Hirel. 1997. Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta.* **201**(4): 224- 433.
- Winicov I., 1998. New Molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Annals of Botany*, **82**: 703-710.
- Woodall J., J. G. Boxall, B. G. Forde and J. Pearson. 1996. Changing perspectives in plant nitrogen metabolism: the central role of glutamine synthetase. *Science Progress*, **79**(1): 1-26.
- Yan S.P., Z. C. Tang, W. Su y W. N. Sun. 2005. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* **5** (1): 235-244.
- Yeo A.R., 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* **49**: 915-29.
- Zhao X. Q. y W. M. Shi. 2006. Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Plant Science.* **170** (4): 748-754.

- Zhu J., 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. **6**(2): 66-71.
- Zhu, J.K., R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, J. M. Pardo y H. J. Bohnert. 2005. Salt and Crops: Salinity Tolerance. En: Success Stories in Agriculture. Council for Agricultural Science and Technology, Autumn/Winter 2005. En : <http://www.faculty.ucr.edu/~jkzhu/articles/2005/bohnert.pdf>
- Zörb C., S. Schmitt, A. Neeb, S. Karl, M. Linder y S. Schubert. 2004. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Science* **167**: 91- 100.